

# **Estudo de conservação da qualidade da biomassa da macroalga vermelha *Asparagopsis taxiformis* em função de diferentes condições de secagem e armazenamento**

**Ana Luísa Regal Sousa**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientadores: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutor Carlos Manuel Lourenço Cardoso, Bolseiro de Pós-Doutoramento da Fundação para a Ciência e Tecnologia

## **Júri:**

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Associada com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutor Carlos Manuel Lourenço Cardoso, Bolseiro de Pós-Doutoramento da Fundação para a Ciência e Tecnologia

## Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar a preservação da qualidade da biomassa da macroalga vermelha *Asparagopsis taxiformis* (composição bioquímica e bioatividades) em função de três fatores: processo de secagem (secagem em forno (60 °C, 72 h) vs. liofilização (-40 °C, 48 h,  $4 \times 10^{-4}$  mbar), temperatura de armazenamento (15±5 °C vs. -20°C) e tempo (3 meses). O processo de secagem no forno foi mais eficaz —o teor de humidade das amostras liofilizadas (L), 5,6 g/100 g p.s., foi superior aos das secas no forno (F), 2,7 g/100 g p.s.. Salvaguardando algumas exceções relativas à bioatividade, a liofilização constituiu o processo mais preservador. Porém, os três meses de armazenamento implicaram alterações das propriedades para ambas temperaturas de armazenamento. Registou-se, para t=0, um teor de EPA (20:5 ω3) superior nas amostras L (8,6 %) em relação às amostras F (1,9 %) e um teor de polifenóis totais também superior nas primeiras. Já a atividade antioxidante apresentou variações apenas nos extratos etanólicos: os das amostras L evidenciaram uma atividade superior para o ABTS, mas inferior para o DPPH. Em relação à atividade anti-inflamatória, para t=0, os extratos (1 mg/ml) apresentaram níveis de inibição da COX-2 superiores nas amostras F (29 %) comparativamente com as amostras L (6 %). Relativamente ao fator tempo, verificou-se nas amostras L uma perda acentuada de EPA ao fim dos três meses (0,3 % em t=3); o teor de polifenóis totais nos extratos etanólicos também decresceu e logo no primeiro mês, não coincidindo com a evolução nos extratos aquosos, nos quais houve um aumento no segundo mês. Estes resultados mostraram a relevância do processo específico de secagem e das condições de armazenamento para a qualidade da biomassa da *A. taxiformis*.

**Palavras-Chave:** *Asparagopsis taxiformis*, processos de secagem, condições de armazenamento, composição bioquímica, bioatividades

## Abstract

The aim of the present study was to evaluate the biomass quality conservation for the red seaweed *Asparagopsis taxiformis* (biochemical composition and bioactivities) according to 3 variables: drying process (oven drying (60 °C, 72 h) vs. freeze-drying (-40 °C, 48 h,  $4 \times 10^{-4}$  mbar)), storage temperature (15±5 °C vs. -20 °C) and time (3 months). The oven drying process was more effective —the moisture content of freeze dried samples (L), 5.6 g/100 g dw, was higher than the oven dried samples (F), 2.7 g/100 g dw. Safeguarding some exceptions relative to bioactivities, freeze-drying was the most conservative drying process. Nevertheless, biomass storage throughout three months involved variation of its properties for both storage conditions. At t=0, EPA (20:5 ω3) content was higher in the L samples (8.6 %) than in the F samples (1.9 %) and the total polyphenol content was higher for the first ones too. On the other hand, the antioxidant activity showed variation only for the ethanolic extracts: L samples exhibited higher values for the ABTS method but lower values for the DPPH method. Concerning anti-inflammatory activity at t=0, macroalga extracts (1 mg/ml) showed higher levels of COX-2 inhibition for the F samples (29 %) comparatively to the L samples (6 %). With respect to time, EPA content of L samples decreased markedly at the end of the study (0.3 % for t=3); the ethanolic total polyphenol content also decreased at the end of the first month, which not coincided with the observed evolution for the aqueous extracts —it was observed an increase in the second month. These results showed the relevance of specific drying process and storage condition for the *A. taxiformis* biomass quality conservation.

**Keywords:** *Asparagopsis taxiformis*, drying processes, storage conditions, biochemical composition, bioactivities

# Índice

<b>Resumo</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>II</b>
<b>Índice</b> .....	<b>III</b>
<b>Lista de Quadros</b> .....	<b>V</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>VI</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 Macroalgas .....	1
1.2 Macroalgas Vermelhas: <i>Asparagopsis taxiformis</i> .....	2
1.2.1 Composição bioquímica .....	3
Hidratos de Carbono .....	3
Fração proteica .....	4
Fração lipídica .....	4
1.2.2 Compostos bioativos .....	5
Atividade Anti-inflamatória dos Ácidos Gordos Polinsaturados $\omega 3$ .....	5
Bioatividade dos pigmentos: clorofilas, carotenóides e ficobiliproteínas .....	6
Atividade antioxidante dos compostos fenólicos .....	7
Bioatividade dos compostos halogenados: bromo e iodo .....	8
1.3 Macroalgas: da colheita ao processamento industrial .....	9
Efeito dos processos de secagem na qualidade da biomassa das macroalgas ...	12
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>14</b>
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	<b>15</b>
3.1 Colheita e preparação da amostra .....	15
3.2 Análise da composição bioquímica .....	16
3.2.1 Composição Proximal .....	16
Teor de humidade e cinza .....	16
Teor de lípidos totais .....	17
Teor de proteína .....	19
Teor de fibra dietética .....	19
Teor de hidratos de carbono .....	20
3.2.2 Caracterização da fração lipídica .....	20
Perfil de ácidos gordos .....	20
Classes lipídicas .....	21
3.2.3 Teor de polifenóis totais .....	22
Preparação dos extratos .....	22

.....	22
Quantificação do teor de polifenóis totais .....	22
3.3 Análise das bioatividades .....	23
3.3.1 Atividade antioxidante.....	23
DPPH.....	23
ABTS .....	24
3.3.2 Atividade anti-inflamatória.....	25
Preparação dos extratos .....	25
Ensaio – método da inibição da ciclooxigenase (COX-2) .....	26
3.4 Análise Estatística .....	27
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>28</b>
4.1 Composição Proximal.....	28
4.2 Perfil de Ácidos Gordos .....	31
4.3 Teor de Polifenóis Totais (TPC).....	36
4.4 Atividade Antioxidante .....	40
Atividade Antioxidante – DPPH .....	40
Atividade Antioxidante – ABTS.....	43
4.5 Atividade Anti- inflamatória .....	46
<b>5. Conclusão e Perspetivas Futuras.....</b>	<b>51</b>
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>53</b>
<b>7. Anexos .....</b>	<b>61</b>

## Lista de Quadros

<b>Tabela 1: Composição proximal</b> (p/p.s.) da <i>A. taxiformis</i> .....	28
<b>Tabela 2: Composição de ácidos gordos</b> (% de ácidos gordos totais e em mg/100g p.s.) da <i>A. taxiformis</i> . ....	32
<b>Tabela 3: Teor de polifenóis totais</b> (mg EAG/100 g p.s.) dos <b>extratos etanólicos</b> da <i>A. taxiformis</i> .....	37
<b>Tabela 4: Teor de polifenóis totais</b> (mg EAG/100 g p.s.) dos <b>extratos aquosos</b> da <i>A. taxiformis</i> .. ....	38
<b>Tabela 5:</b> Atividade antioxidante medida através do <b>método DPPH</b> (mg EAA/100 g p.s.) dos <b>extratos etanólicos</b> da <i>A. taxiformis</i> .. ....	40
<b>Tabela 6:</b> Atividade antioxidante medida através do <b>método DPPH</b> (mg EAA/100 g p.s.) dos <b>extratos aquosos</b> da <i>A. taxiformis</i> . ....	42
<b>Tabela 7:</b> Atividade antioxidante medida através do <b>método ABTS</b> (mmol Etrolox/100 g p.s.) dos <b>extratos etanólicos</b> da <i>A. taxiformis</i> .. ....	43
<b>Tabela 8:</b> Atividade antioxidante medida através do <b>método ABTS</b> (mmol Etrolox/100 g p.s.) dos <b>extratos aquosos</b> da <i>A. taxiformis</i> . ....	45
<b>Tabela 9: Atividade anti-inflamatória</b> (% inibição da COX-2) dos <b>extratos etanólicos</b> da <i>A. taxiformis</i> .. ....	47
<b>Tabela 10: Classes lipídicas</b> (% relativa) da <i>A. taxiformis</i> obtidas por TLC, usando hexano, éter e ácido fórmico (50:50:2) como fase móvel.. ....	63

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Exemplar da macroalga <i>Asparagopsis taxiformis</i> , Arquipélago dos Açores (Portugal).....	3
<b>Figura 2:</b> Planificação do estudo de conservação da qualidade da biomassa da <i>A. taxiformis</i> em função de diferentes condições de secagem (liofilizador vs. forno) e de armazenamento (temperatura ambiente vs. temperatura de congelação) ao longo de 3 meses.....	16
<b>Figura 3:</b> Cadinhos com a cinza da <i>A. taxiformis</i> no final do processo.....	17
<b>Figura 4:</b> Determinação do teor de lípidos totais da <i>A. taxiformis</i> , segundo a metodologia de Folch.....	18
<b>Figura 5:</b> Extratos aquosos e etanólicos das amostras F <sub>0</sub> e L <sub>0</sub> da <i>A. taxiformis</i> .....	22
<b>Figura 6:</b> Reação química envolvida no ensaio de medição da atividade antioxidante através do método DPPH .....	23
<b>Figura 7:</b> Reação química envolvida no ensaio de medição da atividade antioxidante através do método ABTS.....	25
<b>Figura 8:</b> Esquematização do ensaio AChE ELISA.....	26
<b>Figura 9:</b> Correlação entre o teor de polifenóis totais dos extratos etanólicos (mg EAG/100g p.s.) e o teor de EPA (% ácidos gordos totais) das amostras F <sub>0</sub> , L <sub>0</sub> , FA <sub>3</sub> , FC <sub>3</sub> , LA <sub>3</sub> e LC <sub>3</sub> da <i>A. taxiformis</i> .....	46
<b>Figura 10:</b> Efeito do fator tempo na atividade anti-inflamatória (% inibição da COX-2) dos <b>extratos etanólicos</b> da <i>A. taxiformis</i> .....	48
<b>Figura 11:</b> Efeito do fator temperatura de armazenamento (A – ambiente vs. C- congelação) na atividade anti-inflamatória (% inibição da COX-2) dos <b>extratos etanólicos</b> da <i>A. taxiformis</i> .....	49
<b>Figura 12:</b> Curva de calibração para quantificação do teor de polifenóis totais com padrões de ácido gálico. ....	61

<b>Figura 13:</b> Curva de calibração para quantificação da atividade antioxidante (DPPH) com padrões de ácido ascórbico.....	61
<b>Figura 14:</b> Curva de calibração para quantificação da atividade antioxidante (ABTS) com padrões de trolox .....	62
<b>Figura 15:</b> Distribuição das classes lipídicas da <i>A.taxiformis</i> nas placas de TLC.. .....	63
<b>Figura 16:</b> Poster submetido no 49º congresso WEFTA ( <i>West European Fish Technologists Association</i> ), decorrido entre 14-18 de Outubro de 2019 em Tórshavn, Ilhas Faroe.....	64



## Lista de Abreviaturas

**β- CB** – Branqueamento do β-Caroteno (*β-Carotene Bleaching*)

**AA** - Ácido Araquidónico

**ABTS** - Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

**AGLs** - Ácidos Gordos Livres

**ALA** - Ácido α-linolénico (*α-Linolenic Acid*)

**ANOVA** - Análise de Variância (*Analysis of Variance*)

**CT** – Colesterol

**COX** - Ciclooxygenase

**DAG** – Diacilglicerol

**DHA** - Ácido Docosahexanóico (*Docosahexaenoic Acid*)

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**DPPH** - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

**EAA** – Equivalentes de Ácido Ascórbico

**EAG** – Equivalentes de Ácido Gálico

**EPA** - Ácido Eicosapentaenóico (*Eicosapentaenoic Acid*)

**ELISA** - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

**Etrolox** – Equivalentes de Trolox

**FAMES** - Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos (*Fatty Acid Methyl Esters*)

**FDA** - *Food and Drug Administration*

**FDI** – Fibra Dietética Insolúvel

**FDS** - Fibra Dietética Solúvel

**FL** – Fosfatidilcolina

**FRAP** - Poder Antioxidante de Redução Férrica (*Ferric Ion Reducing Antioxidant Power*)

**LA** – Ácido linoleico (*Linoleic acid*)

**MAG** - Monoacilglicerol

**MUFAs** – Ácidos Gordos Monoinsaturados (*Monounsaturated Fatty Acids*)

**PGs** – Prostaglandinas

**PUFAs** - Ácidos Gordos Polinsaturados (*Polyunsaturated Fatty Acids*)

**SFAs** - Ácidos Gordos Saturados (*Saturated Fatty Acids*)

**TAG** – Triacilglicerol

**TFC** – Teor de Flavonóides Totais (*Total Flavonoid Content*)

**TLC**- Cromatografia em Camada Fina (*Thin layer chromatography*)

**TPC** – Teor de Polifenóis Totais (*Total Polyphenol Content*)

**UV** – Radiação ultravioleta

**UV-VIS** – Radiação ultravioleta- visível

# 1. Introdução

## 1.1 Macroalgas

As algas são organismos fotossintéticos que apresentam uma grande diversidade de cores, formas e tamanhos incluindo organismos unicelulares microscópicos – microalgas - e organismos multicelulares macroscópicos que podem apresentar até vários metros de dimensão - macroalgas (Ragonese et al., 2014; Pereira, 2009). As macroalgas podem ser categorizadas em três grupos principais com base na pigmentação que apresentam: Phaeophyta (macroalgas castanhas); Chlorophyta (macroalgas verdes) e Rhodophyta (macroalgas vermelhas) (Pereira, 2009; O'Sullivan et al., 2010).

Segundo um relatório publicado pela FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), em 2014, aproximadamente, 29 milhões de toneladas de macro- e microalgas foram colhidas, a nível mundial, para consumo direto (no estado fresco ou seco) ou para posterior processamento industrial com aplicações na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica. O cultivo de macroalgas é largamente dominado por países asiáticos, nomeadamente, a Indonésia, a China, Filipinas e Japão - o cultivo de espécies tropicais na Indonésia, nomeadamente das macroalgas vermelhas *Kappaphycus alvarezii* e *Eucheuma spp.*, representava, em 2014, o maior contributo para o crescimento da produção de plantas aquáticas a nível mundial (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2016). A incorporação direta da biomassa de várias espécies de macroalgas na alimentação constituiu uma prática tradicional nos países asiáticos – por exemplo, no Japão as macroalgas vermelhas do género *Porphyra*, vulgarmente conhecidas por *Nori*, e a macroalga castanha *Undaria pinnatifida*, vulgarmente conhecida por *Wakame*, são muito utilizadas como complementos em pratos de sushi e sopas (McHugh, 2003; Lindsey e Wilson, 2015).

A nível europeu, particularmente na europa ocidental, a colheita e utilização de macroalgas constitui também uma prática antiga que era direccionada, principalmente, para consumo humano e para aplicações agrícolas (alimentação de gado e enriquecimento de solos) mas atualmente, a indústria europeia deste recurso marinho abrange vários mercados para além do setor alimentar - de facto, o interesse crescente pela incorporação das macroalgas na cozinha deve-se, em parte, às suas propriedades nutricionais de interesse nomeadamente à sua abundância em vitaminas, minerais, fibras e proteína, contudo, estes organismos apresentam outros compostos com propriedades bioativas (polissacáridos, polifenóis, pigmentos) que têm vindo a fomentar

o interesse pelo seu estudo numa perspetiva mais alargada da biotecnologia industrial com inúmeras aplicações (Holdt e Kraan, 2011; Kim et al., 2008; Netalgae, 2012).

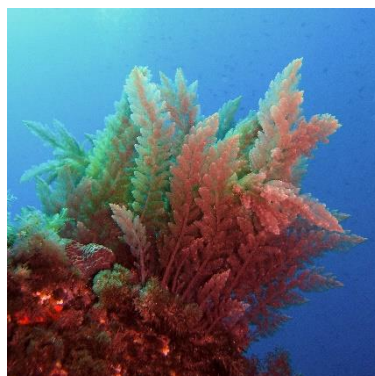
Atualmente, a indústria europeia de macroalgas comercializa produtos para os mais diversos setores industriais, nomeadamente o da indústria agrícola, farmacêutica, cosmética, biomédica e, inclusivamente, o da produção de biocombustíveis, sendo o setor da produção de hidrocolóides (alginatos, agar e carragenanas) aquele que mais se destaca (Netalgae, 2012). Em Portugal, à semelhança de outros países europeus, são comercializadas e industrializadas várias espécies de algas tanto para consumo humano como para aplicações biotecnológicas: a *Ulva intestinalis*, *Osmundea pinnatifida*., *Fucus spiralis*, *Asparagopsis taxiformis* e *Porphyra leucostica* são exemplos de macroalgas utilizadas diretamente na alimentação humana; a *Gelidium spp.* e a *Pterocladia capillacea* são exploradas, sobretudo, para a extração de agar; a *Zonaria tournefortii* e *Cystoseira abies-marina* têm vindo a ser exploradas para aplicações na indústria farmacêutica; macroalgas dos géneros *Laminaria*, *Codium*, *Palmaria*, e *Chondrus* são utilizadas como fertilizantes na indústria agrícola (Netalgae, 2012; Pereira, 2015a; Lindsey e Wilson, 2015).

No entanto, é importante que a exploração de macroalgas como matéria prima para extração e purificação de compostos químicos isolados se torne numa prática sustentável que integre estratégias de economia circular que procurem utilizar, de forma eficiente, a biomassa remanescente para obtenção de outros biocompostos com aplicação biotecnológica (Nunes et al., 2018a). Neste sentido, têm vindo a ser estudadas várias estratégias que procuram estabelecer processos integrados de maximização da utilização da biomassa das macroalgas marinhas que favoreçam a sua utilização completa para redução do impacto ambiental (Stévant, Rebours e Chapman, 2017).

## **1.2 Macroalgas Vermelhas: *Asparagopsis taxiformis***

A *Asparagopsis taxiformis*, ilustrada na **Figura 1**, é uma macroalga vermelha de média dimensão pertencente à família Bonnemaisoniaceae que apresenta uma ampla distribuição global, surgindo, particularmente, em ecossistemas marinhos costeiros tropicais e sub-tropicais (Guiry e Guiry, 2014; Pereira, 2015a). Esta espécie é tipicamente encontrada na região do Pacífico e Indo-Pacífico, incluindo México, Hawai, Califórnia, China, Japão e Austrália, tendo vindo a difundir-se, atualmente, ao longo do Mediterrâneo e da costa Atlântica Europeia e Africana, nomeadamente nos Arquipélagos dos Açores e da Madeira, Cabo Verde e Nigéria. No Hawai, esta macroalga, vulgarmente conhecida como *Limu Kohu*, é tradicionalmente utilizada na forma fresca como alimento, normalmente como acompanhamento de pratos de carne

e peixe. Em Portugal, a *A. taxiformis*, além de ser diretamente comercializada como alga comestível, é também industrializada para aplicações biotecnológicas, nomeadamente na indústria farmacêutica (Genovese et al., 2009; Pereira, 2015a; McHugh, 2003).



**Figura 1:** Exemplar da macroalga *Asparagopsis taxiformis*, Arquipélago dos Açores (Portugal). SeaExpert, 2017.

### 1.2.1 Composição bioquímica

Em termos de composição bioquímica das macroalgas, é importante referir que fatores como a espécie, a época da colheita e a localização geográfica do *habitat* bem como as respetivas condições de temperatura, intensidade luminosa e concentração de nutrientes do meio influenciam significativamente a constituição da sua biomassa (Holdt e Kraan, 2011; Marinho-Soriano et al., 2006). De uma forma geral, as macroalgas são constituídas por um elevado teor de água (80-95 %) e por teores variáveis de nutrientes (hidratos de carbono, proteínas, lípidos, vitaminas e minerais) (Holdt e Kraan, 2011; Kim et al., 2008). Nunes et al. (2017) observou, para a *A. taxiformis*, um teor de cinza (macrominerais e elementos vestigiais) de cerca de 23 %, quase o dobro do registado por El-Baroty et al. (2007) também para esta espécie.

#### **Hidratos de Carbono**

Na grande generalidade das macroalgas, os hidratos de carbono representam a fração maioritária da sua composição, podendo chegar a apresentar um teor de cerca de 74 % do seu peso seco nas macroalgas vermelhas do género *Palmaria* (Holdt e Kraan, 2011; Heo e Jeon, 2009). Esta fração é constituída principalmente por polissacáridos estruturais, como a celulose e a hemicelulose, embora apresentem também alguns grupos de polissacáridos de reserva como o amido florideano. A fibra dietética constitui um grupo importante de polissacáridos, tipicamente utilizados na indústria alimentar devido às suas propriedades moduladoras da textura, que consiste

numa mistura complexa de substâncias orgânicas de grande diversidade estrutural e bioquímica, classificada em dois tipos principais: fibra insolúvel na qual se inserem, por exemplo, a celulose, mananas e xilanas e fibra solúvel à qual pertencem, por exemplo, o agar, carragenanas e o porfirano. El-Baroty et al. (2007), Nunes et al. (2017) e Roque et al (2018) registaram, respetivamente, um teor de fibra de cerca de 22 %, 33 % e 48 % do peso seco da *A. taxiformis* e Nunes et al. (2018a) registou, para esta macroalga, um teor máximo de carragenanas de quase 21 % do seu peso seco.

### **Fração proteica**

A fração proteica das macroalgas representa cerca de 10-40 % do peso seco da sua biomassa, sendo que, de uma forma geral, as macroalgas vermelhas são as que apresentam teores proteicos mais elevados seguidas das macroalgas verdes e castanhas (Pangestuti e Kim, 2015). Roque et al. (2018) registou um teor de proteína de 20 % do peso seco da *A. taxiformis*, valor concordante com o observado por Nunes et al. (2017), 18 %. Em termos de composição em aminoácidos, a maioria das macroalgas contém todos os aminoácidos essenciais, sendo que as macroalgas vermelhas são especialmente ricas em glutamato e aspartato (Fleurence, 2004).

### **Fração lipídica**

De acordo com Manivannan et al. (2008), o teor de gordura total das macroalgas é tipicamente baixo e sofre variações significativas ao longo do ano. De facto, de acordo com a literatura, o teor de gordura parece ser o parâmetro mais suscetível de apresentar variabilidade uma vez que não apresenta concordância entre os vários estudos já realizados. Para o caso da *A. taxiformis*, Ragonese et al. (2014) registou um valor de gordura de cerca de 12 % do seu peso seco, Nunes et al. (2017) observou um valor próximo dos 6,5 %, enquanto que Roque et al. (2018) apresentou um teor de apenas 0,4 %. Em termos de representatividade de classes lipídicas, a generalidade das macroalgas vermelhas apresenta uma maior percentagem de glicolípidos (30-63 %) seguida de triglicéridos (5-38 %) e de fosfolípidos (2-31 %), face à fração lipídica total (Holdt e Kraan, 2011). Relativamente à classe dos esteróis, o seu teor é muito variável, sendo que, nas macroalgas vermelhas, encontra-se, principalmente, desmosterol e colesterol (Sánchez-Machado et al., 2004; Holdt e Kraan, 2011).

Relativamente ao perfil de ácidos gordos da *A. taxiformis*, Ragonese et al. (2014) registaram um teor de ácidos gordos saturados (SFAs) de, aproximadamente, 75 % relativamente à fração total de ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME - *Fatty Acid Methyl Ester*). Destes, os mais abundantes foram o ácido palmítico (16:0) e ácido mirístico (14:0) com teores respetivos de cerca de quase 49 % e 19 % da fração total de FAME's. No que diz respeito aos ácidos gordos monoinsaturados (MUFAs), este estudo

apontou para um total de, aproximadamente, 20 %, destacando-se o ácido palmitoleico (16:1  $\omega$ 7) com cerca de 3 % e o ácido oleico (18:1  $\omega$ 9) com quase 12 %. Em relação aos ácidos gordos polinsaturados (PUFAs), abordados com mais detalhe na **secção 1.2.2**, o teor total registado apresentou um valor de apenas 1,80 %, representado maioritariamente pelo ácido eicosapentanoico, EPA, (20:5  $\omega$ 3), 0,96 %, e o ácido linoleico (18:2  $\omega$ 6), 0,34 %. O ácido docosahexanoico, DHA, (22:6  $\omega$ 3) não foi detetado. Contrariamente, Mellouk et al. (2017) registou um teor total de SFA bastante inferior (cerca de 23%), surgindo o ácido pentadecanoico (15:0) como o mais abundante (cerca de 6 %) – o ácido palmítico (16:0) e o ácido mirístico (14:0) apresentaram teores na ordem dos 3 %, valores muito inferiores aos mencionados no estudo anterior. Relativamente aos ácidos gordos insaturados, o teor total registado de MUFAs e PUFAs foi de cerca de 68 %, destacando-se, no grupo dos monoinsaturados, o ácido pentadecanoico (15:1) com um teor de 9 %. O teor de PUFAs observado neste estudo foi muito mais elevado, surgindo o ácido linoleico com um teor de 7,75 % e o DHA com um teor de quase 33 %, representando o ácido gordo mais abundante. Já a composição lipídica analisada por El-Baroty et al. (2007) detetou um teor maioritário (20 %) de ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3,  $\omega$ 3).

### **1.2.2 Compostos bioativos**

De uma forma geral, as macroalgas, por crescerem em *habitats* complexos com grande variabilidade em termos de salinidade, temperatura, nutrientes, oxigénio e radiação, produzem uma variedade de compostos bioativos durante o seu ciclo de vida que estimulam a sua rápida adaptação. Estudos realizados têm demonstrado que as macroalgas vermelhas sintetizam uma grande variedade de metabolitos bioativos incluindo polissacáridos, proteínas, ácidos gordos polinsaturados, polifenóis e alguns pigmentos que apresentam atividades biológicas tais como atividade antioxidante, antidiabética, anti-inflamatória, antiviral, antibacteriana, anti-tumoral, as quais conferem a estes organismos propriedades nutricionais e farmacológicas de interesse (Pereira, 2015a; Holdt e Kraan, 2011; Ragonese et al., 2014; Maeda, 2013; Pirian et al., 2017).

#### **Atividade Anti-inflamatória dos Ácidos Gordos Polinsaturados $\omega$ 3**

Os ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) são classificados em  $\omega$ 6 e  $\omega$ 3 de acordo com a localização da última ligação dupla relativamente ao terminal metil da molécula – o ácido linoleico (LA, 18:2,  $\omega$ 6) e o ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3,  $\omega$ 3), por não serem sintetizados pelo organismo, são definidos como ácidos gordos essenciais. Uma

vez consumidos, estes ácidos gordos são, posteriormente, metabolizados – o LA é convertido em ácido araquidónico (AA; 20:4  $\omega$ 6) e o ácido  $\alpha$ -linoleico é convertido em ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5  $\omega$ 3) e ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6  $\omega$ 3). O AA, EPA e DHA são depois metabolizados em eicosanóides. Uma vez que estas reações de conversão dos ácidos  $\omega$ 6 e  $\omega$ 3 são catalisadas pela mesma série de enzimas, existe uma competição entre a sua metabolização. A diferença entre os eicosanóides derivados da metabolização dos ácidos gordos  $\omega$ 6 e  $\omega$ 3 é que, no primeiro caso, as moléculas geradas são pro-inflamatórias, enquanto que, no segundo, os compostos obtidos são anti-inflamatórios. Desta forma, a proporção  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 ingerida a partir da dieta representa um importante papel na saúde – um aumento do consumo de  $\omega$ 3 induz uma redução na síntese de eicosanóides derivados do AA e eleva a produção de eicosanóides derivados do EPA e DHA (Schmitz e Ecker, 2008).

A dieta ocidental, caracterizada por uma proporção típica de 15:1–16.7:1 ( $\omega$ 6/ $\omega$ 3) promove o aparecimento e agravamento de patologias como inflamações cardiovasculares, doenças autoimunes e alguns tipos de cancro, ao passo que um aumento dos níveis de  $\omega$ 3 tendem a contrariar estes efeitos. As macroalgas, tal como já referido, contêm vários PUFA  $\omega$ 3 em quantidades significativas e, portanto, o seu consumo poderá representar um bom suplemento para o aumento dos níveis de  $\omega$ 3 na dieta (Ragonese et al., 2014). Robertson et al. (2015) comparou a atividade anti-inflamatória de extratos lipídicos de 3 macroalgas vermelhas (*Porphyra dioica*, *Palmaria palmata* e *Chondrus crispus*) com teores detetados de PUFA  $\omega$ 3 compreendidos entre 34-62 % tendo sido esta atividade também comprovada por Oumaskour et al. (2013) em extratos de *Asparagopsis armata*.

### **Bioatividade dos pigmentos: clorofilas, carotenóides e ficobiliproteínas**

As clorofilas são pigmentos lipossolúveis presentes em todos os grupos de macroalgas que, no caso particular das Rhodophyta, surgem apenas sob a forma de clorofila *a* (Takaichi, 2013). As clorofilas apresentam atividade antioxidante e, uma vez convertidas em feofitina, pirofeofitina e feoforbídeo nos alimentos processados, apresentam potencial atividade anticancerígena (Holdt e Kraan, 2011). Nunes et al. (2017) registou, em extratos metanólicos, um teor de clorofila *a* de, aproximadamente, 29 mg/100 g de peso seco de *A. taxiformis* colhida na costa sul do Arquipélago da Madeira.

Também os carotenóides, outro grupo de pigmentos lipossolúveis tetraterpénicos, carotenos e seus derivados oxigenados (xantofilas) assumem um importante papel como antioxidantes, uma vez que intervêm na neutralização de espécies reativas de oxigénio durante processos metabólicos, apresentando, desta forma, uma forte



bioatividade na prevenção de patologias causadas pelo stress oxidativo (von Elbe e Schwartz, 1996; Okuzumi et al., 1993). As macroalgas vermelhas sintetizam essencialmente  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno, luteína e zeaxantina (Haugan e Liaaen-Jensen, 1994; Pereira, 2015a). Ragonese et al. (2014) registou, em extratos de metanol/acetona, um teor em carotenóides de cerca de 137 mg/100 g de peso seco de *A. taxiformis*, enquanto que Nunes et al. (2017) observou um valor 10 vezes inferior (aproximadamente 13mg/100g), sugerindo que o teor destes pigmentos poderá ser altamente influenciado por fatores externos derivados das condições do *habitat*. Ainda assim, este estudo demonstrou que os extratos de carotenóides apresentaram atividade antioxidante, tendo sido observada uma grande correlação estatística com o FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), possivelmente devido à ação da zeaxantina e luteína que atuam como antioxidantes redutores de ferro e também com o FRSA - DPPH (*Free Radical-Scavenging Assay*), mecanismo de transferência de eletrões para conversão de radicais livres em compostos mais estáveis.

As ficobiliproteínas, ao contrário das clorofilas e dos carotenóides, são um grupo de pigmentos solúveis em água—a ficoeritrina (ficobiliproteína de coloração vermelha) pode chegar a representar 1,2 % do peso seco de *P. palmata* (Lobban et al., 2014; Chronakis et al., 2000). Estes pigmentos, para além de serem utilizados como corantes naturais na indústria alimentar e cosmética, têm também vindo a ser estudados no âmbito da sua potencial ação antioxidante, anti-inflamatória, antiviral e anti-tumoral (Sekar e Chandramohan, 2008).

### **Atividade antioxidante dos compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos constituem uma classe química estruturalmente caracterizada pela presença de um grupo hidroxilo (-OH) diretamente ligado a um grupo aromático e representam um grupo molecular de grande destaque no que diz respeito a atividades biológicas, principalmente à atividade antioxidante (Holdt e Kraan, 2011).

Nunes et al. (2017) registou, em extratos de *A. taxiformis*, um teor de compostos fenólicos totais (TPC) de, aproximadamente, 58 mg/100g peso seco (em equivalentes de ácido gálico) que, por sua vez, apresentaram uma grande correlação estatística com a atividade antioxidante medida através do ensaio de FRSA- DPPH, FRAP e  $\beta$ -CB (*beta-carotene Bleaching Assay*). Esta correlação positiva entre TPC e o ensaio  $\beta$ -CB sugere uma forte contribuição da componente lipofílica dos compostos fenólicos presentes para a atividade antioxidante dos extratos, igualmente demonstrada por Chew et al. (2008). Segundo Pereira (2015a), o TPC é suscetível de apresentar uma grande variabilidade na mesma espécie de macroalgas devido às próprias condições do seu *habitat*, em particular, à intensidade da radiação solar.

### **Bioatividade dos compostos halogenados: bromo e iodo**

As macroalgas vermelhas, em particular a *A. taxiformis*, são uma fonte rica de halogêneos, maioritariamente de bromo e iodo. Estes átomos surgem nas mais diversas classes de metabolitos, primários e secundários, aos quais se tem vindo a associar atividades biológicas de interesse farmacológico como atividade antibacteriana e anti-tumoral (Vairappan et al., 2001; Fuller et al., 1992; McConnell e Fenical, 1977; El-Baroty et al., 2007). Vários compostos halogenados assumem um papel de inibidores enzimáticos capazes de se ligarem a resíduos de aminoácidos específicos de várias proteínas, tendo McConnell e Fenical (1977) comprovado a atividade antibacteriana de extratos de *A. taxiformis*, relacionando a presença de metabolitos halogenados (halometanos, halocetonas e halocetatos) com a toxicidade observada.

Os compostos bromados das macroalgas do género *Asparagopsis*, tais como o bromofórmio, parecem apresentar, no caso da *A. armata*, uma ação inibitória efetiva no crescimento bacteriano de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus spp*, e de bactérias metanogénicas, no caso da *A. taxiformis* (Paul, de Nys e Steinberg, 2006; Roque et al., 2018). Esta descoberta é, particularmente, interessante no que diz respeito à ação inibitória da *A. taxiformis* no microbioma de bactérias metanogénicas uma vez que segundo Roque et al. (2018), a incorporação de 5 % da biomassa desta alga na ração das vacas pode levar a reduções acima de 90 % na produção de metano no seu rúmen, verificando-se, inclusivamente, uma melhor utilização do valor nutricional da ração. Tendo em conta que as emissões de metano pelas vacas assumem uma grande relevância no conjunto de emissões de gases do efeito de estufa e o muito maior poder do metano do que o dióxido de carbono na geração deste efeito, a incorporação da *A. taxiformis* nas rações constitui uma promissora estratégia de mitigação deste problema.

Além do bromo, Nunes et al. (2018a) detetou, na *A. taxiformis*, um teor máximo de iodo de 3,37 % do seu peso seco - o teor de iodo presente nas macroalgas é um parâmetro importante uma vez que este composto, por ser parte integrante da composição de hormonas da tiróide, torna-se essencial em processos metabólicos como termorregulação, respiração celular e catabolismo de nutrientes. Por assumir um papel tão importante na fisiologia humana, a ingestão de tores baixos de iodo, particularmente na infância e gravidez, contribui para o desenvolvimento de problemas de saúde. De acordo com Hou, Yan e Chain (2000), o iodo pode ser encontrado, predominantemente, ligado a proteínas, polifenóis e pigmentos.

### 1.3 Macroalgas: da colheita ao processamento industrial

A primeira fase do processamento industrial das macroalgas refere-se à colheita – esta primeira etapa pode ser realizada de forma manual ou mecânica, dependendo da escala de produção, da natureza da exploração, que tanto pode ocorrer diretamente no *habitat* natural como num contexto controlado de cultivo em aquacultura, e ainda do tipo de remoção pretendida (total ou parcial) (Netalgae, 2012; Radulovich et al., 2015).

Uma vez colhidas, as macroalgas são sujeitas a um pré-tratamento de limpeza, normalmente com água do mar, para remoção de impurezas e contaminantes como areia, lama e outros detritos. Eventualmente, dependendo da aplicação das macroalgas e do próprio local da colheita, algumas amostras colhidas podem ser submetidas a análises microbiológicas e químicas para identificação de possíveis contaminantes e avaliação das características pretendidas em termos de composição bioquímica (Radulovich et al., 2015; Stévant, Rebours e Chapman, 2017). Após este pré-tratamento de limpeza, segue-se o armazenamento da matéria-prima que constitui um verdadeiro desafio para as indústrias, uma vez que, tal como já referido na **secção 1.2.1**, a generalidade das macroalgas apresenta uma elevada percentagem de humidade que pode ultrapassar os 90 % do peso húmido —o elevado teor de água torna estes organismos altamente perecíveis que facilmente sofrem deterioração e decomposição bioquímica em poucos dias após a colheita (Enríquez et al. 1993; Le Lann, Jégou e Stiger-Pouvreau, 2008; Gupta, Cox e Abu-Ghannam, 2011; Suherman et al., 2018; Mabeau e Fleurence, 1993). Desta forma, torna-se imperativo que se apliquem condições de armazenamento e métodos de conservação apropriados de forma preservar a qualidade da biomassa e as propriedades desejáveis, garantindo também a segurança do produto.

No que diz respeito à comercialização das macroalgas no seu estado fresco, principalmente para consumo direto na alimentação humana, a aplicação de condições adequadas durante o armazenamento é crucial para a preservação das propriedades sensoriais e nutricionais da biomassa. Liot, Colin e Mabeau (1993) estudou a influência do tipo de lavagem pós-colheita na qualidade da biomassa das macroalgas *P. palmata* e *Ulva rígida* durante um período de armazenamento de duas semanas – uma fração de amostras não sofreu qualquer tratamento de lavagem, uma segunda fração foi lavada com água do mar esterilizada e uma terceira foi lavada com água da rede. As amostras foram armazenadas em porções de 100 g em sacos de rede a uma temperatura de refrigeração de 4 °C durante duas semanas. Observou-se, para ambas as espécies, que as amostras não lavadas e as lavadas com água do mar esterilizada apresentaram uma

retenção satisfatória das suas propriedades sensoriais (textura, cor e odor) e a manutenção do baixo nível de mesófilos aeróbios, fungos e leveduras ao longo das duas semanas. Já as amostras lavadas com água da rede apresentaram, igualmente em ambas as espécies, sinais de degradação logo ao fim de três dias —o estudo sugeriu que a lavagem com água da rede induziu ruturas celulares e diluição do teor de sal com consequente redução da microflora marinha inerente às macroalgas e proliferação de microrganismos contaminantes, responsáveis pela degradação precoce. Ainda assim, tirando o caso das amostras lavadas com a água da rede, o período de duas semanas durante o qual se verificou um estado de conservação satisfatório é bastante superior ao período de dois-três dias verificado por alguns produtores —uma possível explicação para tal diferença pode estar relacionada com o facto de, à escala industrial, os sacos de armazenamento conterem quantidades de biomassa consideravelmente superiores às 100 g testadas neste estudo levando a que a temperatura no interior dos sacos aumente acima da temperatura de armazenamento, favorecendo o crescimento microbiano e acelerando a degradação da matéria-prima (Kadam et al., 2015).

Para o armazenamento da matéria-prima no estado fresco por períodos mais prolongados, a congelação convencional das macroalgas constitui uma prática comum dado a garantia de preservação da qualidade que este método de conservação apresenta para a generalidade dos alimentos frescos. No entanto, até mesmo o processo de congelação convencional, apesar de retardar algumas reações de degradação e inibir o crescimento microbiano, acarreta sempre alguma perda de qualidade em termos sensoriais e nutricionais. Alguns estudos demonstraram que a formação de grandes cristais de gelo durante a congelação de frutas e vegetais com elevados teores de água pode provocar danos irreversíveis nas estruturas celulares que comprometem a qualidade dos produtos após a descongelação (Reid, 1990). Desta forma, para minimizar este fenómeno, torna-se importante que se selecionem as condições ótimas de congelação. Choi et al. (2012) procurou testar o efeito de diferentes condições de armazenamento à temperatura de congelação na qualidade da biomassa da macroalga castanha *U. pinnatifida*, durante um período de dois meses – neste estudo, as amostras frescas, acondicionadas em sacos de polietileno fechados sob vácuo, foram sujeitas a diferentes temperaturas de congelação (-10, -20, -30 e -40 °C) em diferentes meios de congelação (meios aquosos com 50, 75 e 100 % de água do mar esterilizada e sem meio aquoso) e, posteriormente, ao fim de dois meses, a diferentes períodos de descongelação com água da rede (6, 12, 18 e 24 h). Verificaram que as amostras que apresentaram menores níveis de alteração em termos sensoriais e microbiológicos foram aquelas que ficaram sujeitas a uma temperatura de congelação de -30 °C com um meio aquoso enriquecido com 50 % de água do mar e que sofreram,

posteriormente, o descongelamento durante um período de 6 h. Além disto, estas amostras sujeitas às condições ótimas foram, depois, armazenadas a 10 °C durante cinco dias, não tendo sido detetadas, durante este período, alterações significativas a nível sensorial e microbiológico com exceção da resistência à tração que sofreu um decréscimo significativo ao fim de quatro dias, possivelmente pela eventual desintegração de tecidos.

A conservação do estado fresco das macroalgas pode ainda ser conseguido ao nível do embalamento propriamente dito – a embalagem com atmosfera modificada (MAP – *Modified Atmosphere Packaging*) pode constituir uma opção eficiente na preservação das propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos de origem marinha, inclusivamente das macroalgas: a aplicação de misturas de gases com elevados níveis de CO<sub>2</sub> inibe o crescimento e proliferação de várias bactérias aeróbios contaminantes (Lannelongue et al., 1982; Farber, 1991). Mol, Uçok Alakavuk e Ulusoy (2014) verificou que amostras de sushi (compostas por salmão, arroz e porções de macroalgas do género *Porphyra*) embaladas com atmosfera modificada apresentaram menores alterações a nível sensorial e registaram níveis de bactérias aeróbias (mesófilas e psicrófilas) significativamente inferiores, comparativamente com as amostras embaladas em condições atmosféricas normais.

No que diz respeito à comercialização de macroalgas que não exige a manutenção da matéria-prima no estado fresco, a secagem representa o procedimento mais frequentemente aplicado uma vez que, diminuindo a atividade de água, além da degradação bioquímica e microbiológica ser minimizada, o volume de armazenamento é reduzido (Mabeau e Fleurence, 1993; Suherman et al., 2018). Normalmente, a nível industrial, a biomassa, depois do processo de secagem, é armazenada a uma temperatura de 0-4 °C ou a cerca de -18 °C, dependendo, respetivamente, se se trata de matéria-prima seca ou semi-seca (Gupta, Cox e Abu-Ghannam, 2011; Kadam et al., 2015). Os métodos aplicados incluem procedimentos mais tradicionais como a simples secagem ao ar e/ou com exposição solar ou métodos mais dispendiosos e/ou inovadores como a secagem em fornos de ar quente e liofilização. A secagem ao sol constitui o método mais simples e barato, no entanto, para além da eficácia do processo ser dependente das condições meteorológicas, pode ainda comprometer a qualidade sanitária do produto. Por outro lado, a secagem em fornos ou em liofilizadores requer um maior investimento, tanto em termos de equipamentos como em termos de consumo de energia e, em função da quantidade de matéria-prima a processar e da aplicação do produto final, pode ou não representar a alternativa mais eficaz ou rentável (Kadam et al., 2015; Stévant, Rebours e Chapman, 2017).

## **Efeito dos processos de secagem na qualidade da biomassa das macroalgas**

Apesar da secagem constituir um método eficaz no que diz respeito à conservação e estabilização da biomassa das macroalgas não comercializadas no estado fresco, a realidade é que vários estudos têm vindo a demonstrar que a aplicação de elevadas temperaturas durante este processo provoca alterações significativas nas suas propriedades nutricionais, funcionais e biológicas (Stévant, Rebours e Chapman, 2017).

Gupta, Cox e Abu-Ghannam (2011) procurou estudar o efeito da secagem em forno de ar quente no teor total de compostos fenólicos (TPC) e flavonóides (TFC) e na atividade antioxidante da macroalga castanha *Himanthalia elongata*, aplicando diferentes temperaturas de secagem (25, 30, 35 e 40 °C) durante 24 h. Verificaram, para todas as temperaturas, uma redução significativa nos TPC e TFC, acompanhada por uma diminuição da atividade antioxidante, comparativamente com os extratos frescos. No entanto, ao fim de 2-4 h de secagem (momento em que o teor de humidade teria sido reduzido em cerca de 50 %), detetaram um aumento no TPC, que sugerem ter resultado de uma resposta da macroalga ao stress induzido no momento do corte para preparação dos extratos.

Jiménez-Escrig et al. (2001) submeteu macroalgas dos géneros *Fucus* (macroalga castanha) e *Porphyra* (macroalga vermelha) a um processo de secagem em forno de ar quente (50°C, 48 h) e posterior armazenamento à temperatura ambiente tendo constatado uma redução significativa no teor total de polifenóis e na atividade antioxidante comparativamente com os extratos frescos. Um outro estudo procurou avaliar o efeito da secagem na composição nutricional da macroalga castanha *Sargassum hemiphyllum*, aplicando três métodos distintos: secagem solar (4 dias), forno de ar quente (60°C, 15 h) e liofilização (6 dias), verificando, para todos os procedimentos, reduções significativas na composição nutricional dos extratos. Os extratos submetidos à secagem solar e à liofilização apresentaram uma qualidade nutricional muito similar embora, o segundo método tenha demonstrado uma retenção significativamente superior de alguns componentes importantes como a vitamina C e alguns ácidos gordos polinsaturados (18:3  $\omega$ 3, 18:4  $\omega$ 3, 20:4  $\omega$ 6 e 20:5  $\omega$ 6). Apesar da secagem no forno de ar quente ter constituído o método mais rápido, foi o que provocou as maiores perdas nutricionais entre todos os extratos analisados, exceto na componente mineral, a qual não é termodegradável (Chan, Cheung e Ang, 1997).

Le Lann, Jégou e Stiger-Pouvreau (2008) também procurou comparar o efeito de diferentes métodos de conservação na preservação da biomassa das macroalgas castanhas *Sargassum muticum* e *Bifurcaria bifurcata*, aplicando métodos de secagem solar em estufa (72 h), forno de ar quente (50-60 °C, 40 h), liofilização (72 h) e congelação (-20 °C, 3 semanas). Verificaram que, comparativamente com todos os procedimentos aplicados, o TPC foi superior nos extratos frescos, não tendo, no entanto, os extratos liofilizados e congelados apresentado um teor significativamente inferior. Tal como o estudo referido anteriormente já tinha sugerido, a liofilização parece ser o método mais adequado à preservação das propriedades da biomassa das macroalgas, principalmente no que diz respeito a compostos termossensíveis. Além disto, este estudo sugere ainda que, além da natureza química dos compostos fenólicos, também a própria morfologia das macroalgas pode constituir um fator determinante na forma como as diferentes condições de secagem/armazenamento podem afetar o seu teor. Por exemplo, comparando o efeito do tratamento de secagem em forno e solar, o teor de compostos fenólicos na *S. muticum* foi mais afetado do que na *B. bifurcata* – em termos de morfologia, a *B. bifurcata* apresenta um tecido mais espesso que acaba por diminuir a superfície de contacto com a atmosfera comparando o que poderá funcionar como uma barreira de proteção tanto à elevada temperatura como às radiações UV. De uma forma geral, os vários estudos realizados têm mostrado que, de facto, a temperatura tem um efeito direto na degradação de alguns componentes dos tecidos das macroalgas, em particular, dos compostos fenólicos.

A escolha do método de secagem mais apropriado deve ter sempre em conta não só o contexto ambiental e económico, mas também a quantidade de biomassa a processar e a aplicação final da macroalga, especificamente, se esta terá como destino a alimentação humana, a alimentação animal, a aplicação medicinal ou farmacêutica ou se será utilizada como uma fonte específica de um nutriente (Chan, Cheung e Ang, 1997).

## 2. Objetivos

A conservação e armazenamento industrial das macroalgas constituem um verdadeiro desafio uma vez que estes organismos apresentam um elevado teor de água na sua composição - a secagem, apesar de constituir um método eficaz no que diz respeito à conservação e estabilização da sua biomassa, acarreta alterações significativas nas suas propriedades nutricionais, funcionais e biológicas.

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a conservação da qualidade da biomassa da macroalga vermelha *A. taxiformis* em função de três fatores: processo de secagem (secagem em forno (60 °C, 72 h) vs. liofilização (-40 °C, 48 h,  $4 \times 10^{-4}$  mbar)), temperatura de armazenamento (temperatura ambiente (15±5 °C) vs. temperatura de congelação (-20 °C)) e tempo (o estudo teve a duração de 3 meses). O objetivo principal foi conseguido através da concretização dos seguintes pontos:

- caracterização inicial e final da composição bioquímica das amostras secas em termos de composição proximal (teor de humidade, cinza, proteína, hidratos de carbono e de lípidos totais) e de composição da fração lipídica (perfil de ácidos gordos e classes lipídicas);
- avaliação inicial, intermédia (ao fim de 1 e 2 meses) e final do teor de polifenóis totais e das suas propriedades biológicas, nomeadamente a atividade antioxidante (com base nos métodos DPPH e ABTS) e atividade anti-inflamatória (com base no método de inibição da COX-2);



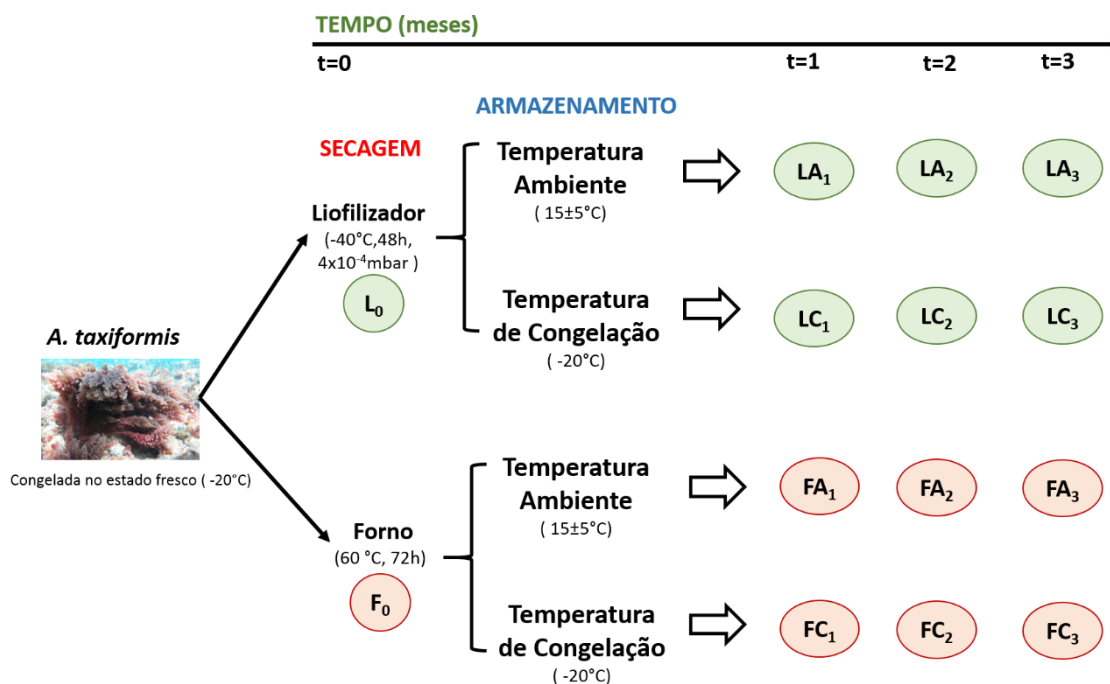
### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Colheita e preparação da amostra

A *A. taxiformis* foi colhida e fornecida pela empresa seaExpert - Serviços E Consultadoria Na Área Das Pescas, Lda., sediada na ilha do Faial, Açores. A alga foi colhida a 2 de novembro de 2018 e, após ter sido lavada com água do mar, ficou congelada a -20 °C até ter sido enviada para o IPMA onde ficou armazenada nas mesmas condições até ao momento da sua utilização.

Posteriormente, em fevereiro de 2019, o bloco de alga congelado foi cortado em pedaços e cerca de 2 kg foram secos num liofilizador e cerca de 2,7 kg foram secos num forno. A liofilização, com prévia passagem da amostra por arca a -80 °C, ocorreu durante 48 horas a uma temperatura de -40 °C e a uma pressão de  $4 \times 10^{-4}$  mbar num liofilizador (Heto Power Dry LL3000, Thermo Fisher Scientific, USA) com bomba de vácuo acoplada (RZ 6 Rotary Vane Pump, Vacuubrand, Germany). A secagem no forno ocorreu a 60 °C durante 72 horas num equipamento sem circulação de ar (Memmert, Germany). Após a secagem, as amostras foram trituradas à temperatura ambiente num moinho (Grindomix GM 200, Retsch, Germany) com 3 ciclos de 5 segundos a 3000 rpm e 2 ciclos de 5 segundos a 5000 rpm e posteriormente acondicionadas em sacos selados com vácuo moderado (200 mbar).

Tal como ilustrado esquematicamente na **Figura 2**, foi realizado um estudo de conservação ao longo de 3 meses: uma fração de cada amostra, liofilizada (L) e seca no forno (F), foi armazenada a -80 °C para realização de uma análise inicial ( $L_0$  e  $F_0$ ) da composição bioquímica (composição proximal, caracterização do perfil lipídico, e teor de polifenóis totais) e das bioatividades antioxidante e anti-inflamatória; a outra fração foi submetida a duas temperaturas distintas de armazenamento - parte foi deixada à temperatura ambiente de  $15 \pm 5$  °C ( $L_A$  e  $F_A$ ) e outra parte foi armazenada numa arca de congelação à temperatura de -20 °C ( $L_C$  e  $F_C$ ). Ao fim de 1 e 2 meses realizaram-se análises intermédias ao teor de polifenóis totais e às bioatividades e, ao fim de 3 meses, realizou-se uma análise final igual à inicial (composição bioquímica e bioatividades). É de referir que as amostras, ao longo do tempo, foram sempre transferidas para -80 °C até à realização de cada análise.



**Figura 2:** Planificação do estudo de conservação da qualidade da biomassa da *A. taxiformis* em função de diferentes condições de secagem (liofilizador vs. forno) e de armazenamento (temperatura ambiente vs. temperatura de congelação) ao longo de 3 meses. L<sub>0</sub> e F<sub>0</sub> – análises iniciais (composição bioquímica e bioatividades); LA<sub>1</sub>, LA<sub>2</sub>, LC<sub>1</sub>, LC<sub>2</sub>, FA<sub>1</sub>, FA<sub>2</sub>, FC<sub>1</sub> e FC<sub>2</sub> – análises intermédias (polifenóis totais e bioatividades); LA<sub>3</sub>, LC<sub>3</sub>, FA<sub>3</sub> e FC<sub>3</sub> – análises finais (composição bioquímica e bioatividades).

## 3.2 Análise da composição bioquímica

### 3.2.1 Composição Proximal

#### Teor de humidade e cinza

O teor de humidade, por peso húmido, presente na alga no seu estado fresco foi estimado com base na pesagem da amostra antes e após o processo de secagem.

Os teores de humidade e de cinza, por peso seco, foram determinados com base na metodologia de análise da AOAC (2000) para avaliar, respetivamente, a quantidade de água e de matéria inorgânica (minerais obtidos por incineração da matéria orgânica) presentes nas amostras secas. Nesta metodologia, cerca de 2 g de cada amostra foram pesados em duplicado para cadinhos de porcelana (os cadinhos foram previamente secos num forno a 103 °C durante 30 minutos e pesados depois de terem sido deixados a arrefecer num exsiccador durante 1 hora). Os cadinhos com as amostras foram depois deixados no forno (103 °C) durante a noite e, após terem arrefecido, foram pesados para determinação do teor de humidade, em g/100 g peso seco, com base na **equação 1**:

$$\%Humidade \left( \% \frac{m}{m} \right) = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_1 - m_3)} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

$m_1$  – massa do cadinho com a amostra húmida (g)

$m_2$  – massa do cadinho com a amostra seca, após forno (g)

$m_3$  – massa do cadinho (g)

Os mesmos cadinhos, foram, depois, deixados durante mais uma noite numa mufla a 500 °C e, no dia seguinte, depois de arrefecidos num exsiccador, foram pesados. De seguida, os cadinhos, foram levados novamente à mufla durante mais 30 minutos à mesma temperatura e pesados uma segunda vez após arrefecerem. Os cadinhos que apresentaram, nesta segunda pesagem, uma massa inferior à da primeira (com uma diferença superior a 1 mg) foram novamente levados à mufla e o processo terminou quando a massa registada apresentou um valor igual, superior ou com uma diferença inferior a 1 mg relativamente à anterior. O teor de cinza foi calculado em g/100 g peso seco, segundo a **equação 2**:

$$\%Cinza \left( \% \frac{m}{m} \right) = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_3 - m_2)} \times 100 \quad (2)$$

Em que:

$m_1$  – massa do cadinho com a cinza (g)

$m_2$  – massa do cadinho (g)

$m_3$  – massa do cadinho com a amostra (g)



**Figura 3:** Cadinhos com a cinza da *A. taxiformis* no final do processo. Ana Sousa, Junho 2019.

### **Teor de lípidos totais**

A fração de lípidos totais das amostras foi extraída e quantificada com base na metodologia de Folch (Folch et al., 1957). Neste método, 200 mg de cada amostra foram pesados em triplicado para tubos aos quais se adicionaram 3 ml de uma solução de

clorofórmio e metanol (2:1) para induzir a extração dos lípidos. De seguida, os tubos foram deixados num agitador à temperatura ambiente, durante 10 minutos com agitação constante de 250 rpm aos quais foram, posteriormente, adicionados 3 ml de uma solução de ácido clorídrico (para precipitação das proteínas) e 300 µl de uma solução de cloreto de magnésio (para indução de uma melhor separação entre componentes hidrofílicos e lipofílicos por aumento da força iónica). De seguida, os tubos foram centrifugados (5 minutos, 4 000 rpm a 4°C) e a fase orgânica (inferior) foi extraída para novos tubos previamente pesados - a fase orgânica extraída foi filtrada através de uma coluna com algodão e sulfato de sódio anidro para remoção de impurezas e retenção de humidade (**Figura 4**). Após esta primeira extração, adicionaram-se mais 3 ml de clorofórmio:metanol (2:1) aos tubos das amostras e procedeu-se novamente à sua agitação e centrifugação nas condições já mencionadas para se realizar uma segunda extração e filtração da fase orgânica. No final, a coluna foi lavada com 2 ml de clorofórmio puro para assegurar a completa remoção de lípidos da coluna e os tubos com a fase orgânica recolhida foram, depois, postos sob uma corrente de azoto para evaporação do solvente. Após a evaporação, os tubos foram pesados e o teor de gordura, expresso em g/100 g peso seco, foi determinado segundo a **equação 3**:

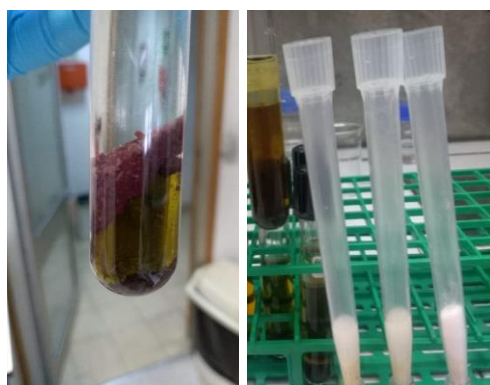
$$\% \text{ teor de lípidos totais} = \frac{(mf - mi)}{ma} \times 100 \quad (3)$$

Em que:

*mf* – massa do tubo com resíduo lipídico (g)

*mi* – massa do tubo (g)

*ma* – massa da amostra (g)



**Figura 4:** Determinação do teor de lípidos totais da *A.taxiformis*, segundo a metodologia de Folch: à esquerda, tubo para primeira extração da fase orgânica (inferior); à direita, colunas de algodão com sulfato de sódio anidro para filtração da fase orgânica. Ana Sousa, Agosto 2019.

### ***Teor de proteína***

O teor de proteína das amostras foi determinado de acordo com o método de Dumas (Saint-Denis e Goupy, 2004) que se baseia no doseamento do nitrogénio elementar presente na amostra. Na presença de oxigénio, uma determinada massa conhecida de amostra é inserida numa câmara a elevada temperatura (990 °C) onde ocorre a combustão do nitrogénio e do carbono e, seguidamente, a redução dos óxidos de nitrogénio a nitrogénio elementar é doseado e automaticamente convertido em g/100 g peso seco de acordo com um fator de conversão adequado. Cada amostra foi pesada em triplicado (cerca de 100 mg), envolvida num papel de alumínio especial e depois colocada num amostrador automático do equipamento de determinação de Nitrogénio/Proteína (FP-528, LECO, USA). O etilenodiamino tetra-acetato (EDTA) foi utilizado como padrão de calibração e o fator de conversão aplicado nas amostras foi de 5.5 (Sosulski e Imafidon, 1990). Os resultados foram expressos em g/100 g peso seco.

### ***Teor de fibra dietética***

O teor de fibra dietética (solúvel e insolúvel) foi determinado com recurso a um kit enzimático (Megazyme Total Dietary Fiber Kit (K-TDFR-100A/K-TDFR-200A 04/17), Irland) desenvolvido com base na metodologia de Lee et al. (1992) e Prosky et al. (1988). Dois brancos e a amostra (1 g pesado em duplicado) foram submetidos a três reações enzimáticas sequenciais em 40 ml de tampão MES-TRIS (pH 8,2): 50 µl de  $\alpha$ -amilase (98-100 °C, 30 minutos) para hidrólise e despolimerização do amido; 100 µl de protease (60 °C, 30 minutos) para despolimerização das proteínas; 200 µl de amiloglucosidase (60 °C, 30 minutos) para hidrolisar os fragmentos de amido a monómeros de glucose. Entre a segunda e a terceira reação enzimática, procedeu-se a uma retificação do pH com adição de 5ml de solução de HCl (0,561 N) e respetivo ajuste para 4,1-4,8. De seguida, para determinação do teor de fibra dietética insolúvel (FDI) procedeu-se à filtração sob vácuo da mistura obtida em cadinhos de Gooch previamente pesados e uniformemente cobertos com aproximadamente 0,6400 g de celite. O resíduo obtido foi lavado com duas porções de 10ml de água destilada pré-aquecida a 70 °C e a mistura do filtrado + águas de lavagem foi armazenada e pesada em frascos de Schott (previamente pesados) para posterior determinação do teor de fibra dietética solúvel (FDS). Os cadinhos com o resíduo da FDI foram ainda lavados com duas porções de 10 ml de etanol (95 %) e acetona e deixados a secar no forno durante a noite a 103 °C. Depois de arrefecidos, os cadinhos+celite+resíduo foram pesados para determinação da massa do resíduo. Por fim, procedeu-se à determinação do teor de cinza e de proteína presente nos resíduos obtidos conforme já descrito em 2.1.1 e em 2.1.3,

respetivamente. No que diz respeito à determinação do teor de FDS, foram adicionados aos frascos de Schott 4 volumes de etanol (95 %) pré-aquecido a 60 °C à mistura do filtrado+ águas de lavagem e deixado a precipitar 1 hora à temperatura ambiente. De seguida, repetiu-se o procedimento de filtração já descrito para a FDI, sendo que os cadinhos com o resíduo de fibra solúvel foram lavados com duas porções de 15 ml de etanol (78 %), etanol (95 %) e acetona. A massa do resíduo com a FDI foi igualmente determinada após secagem dos cadinhos e os teores de cinza e proteína foram determinados. Os resultados de FDI e FDS, expressos em g/100 g peso seco, foram determinados segundo a **equação 4**:

$$\% \text{ Fibra (insolúvel ou solúvel)} = \frac{(m1-m2-m3-m0)}{ma} \times 100 \quad (4)$$

*Em que:*

*m1 – massa de celite+resíduo (g)*

*m2 – massa de proteína no resíduo de fibra (insolúvel ou solúvel) (g)*

*m3 – massa de cinza no resíduo de fibra (insolúvel ou solúvel) (g)*

*m0 – massa do branco (g)*

*ma – massa de amostra (g)*

### **Teor de hidratos de carbono**

O teor de hidratos de carbono, expresso em g/100 g peso seco, foi determinado com base na diferença entre 100 % e a soma dos teores, por peso seco, de humidade (humidade residual após secagem), cinza, proteína e lípidos totais.

### **3.2.2 Caracterização da fração lipídica**

#### **Perfil de ácidos gordos**

Os ácidos gordos presentes nas amostras foram identificados e quantificados com base na metodologia de transesterificação via catálise ácida (FAMES - Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos) descrita por Bandarrra et al. (1997). Foram pesados 300mg de cada amostra em triplicado para tubos de 15 ml aos quais foram adicionados padrão interno e 5 ml de uma solução de cloreto de acetilo:metanol (1:19). Depois dos tubos terem sido agitados no vórtex durante 30 segundos, foram colocados num banho a 80°C durante 1 hora. Uma vez arrefecidos (30 minutos à temperatura ambiente), foram adicionados 1ml de água ultra-pura e 2 ml de n-heptano e levados a centrifugar (5 minutos, 4000 rpm a 4 °C). Após a centrifugação, a fase orgânica (superior) foi recolhida e filtrada para novos tubos previamente pesados, tendo sido aplicado o mesmo procedimento já descrito para a determinação do teor dos lípidos totais. Finalmente, para a análise cromatográfica dos ésteres metílicos dos ácidos gordos, 2 µl da fase

orgânica recolhida foi injetada numa coluna capilar (DB-WAX, Agilent Technologies, USA) com espessura de 0,25 µm, 30 m × 0,25 mm d.i., integrada com um cromatógrafo gasoso (Varian Star 3800 CP, Walnut Creek, USA) equipado com um detetor de ionização de chama e um amostrador automático com um *split injector* (1:100), ambos a 250°C. A separação foi efetuada através da utilização de hélio como gás de arraste e seguindo um programa de aumento de temperatura - inicialmente, partindo de uma temperatura mínima de 180 °C até aos 200 °C (4°C/minuto), permanecendo aqui durante 10 minutos, e depois aquecendo, à mesma taxa, até à temperatura máxima de 210 °C, estabilizando nesta temperatura durante 14,5 minutos.

Os ésteres metílicos de ácidos gordos foram identificados através da comparação do seu tempo de retenção com os do padrão da Sigma–Aldrich (PUFA-3, Menhaden oil). O limite de deteção (LOD) foi de 1 mg/100 g. Os resultados foram expressos em percentagem de ácidos gordos totais com base nas áreas dos picos dos respetivos cromatogramas e em mg/100g com base no método do padrão interno (ácido heneicosano (21:0, 1 mg/ml).

### **Classes lipídicas**

As principais classes lipídicas foram analisadas por cromatografia em camada fina (TLC) com recurso a placas de sílica gel G (0,25 mm) tal como descrito por Bandarra et al. (1997). A partir do resíduo de lípidos totais obtido, procedeu-se da seguinte forma: a cada réplica de uma amostra foram adicionados 2 ml de clorofórmio e o conteúdo das 3 réplicas foi misturado num único tubo previamente pesado – *pool*. O solvente de cada *pool* foi, posteriormente, evaporado sob corrente de azoto e o resíduo obtido foi pesado para ressuspensão em clorofórmio numa concentração final de 10 mg/ml. Paralelamente, foram preparados 2 padrões com a mesma concentração em clorofórmio: padrão misto (triacilglicerol (TAG), 1,2 e 1,3-diacilglicerol (DAG-1,2 e DAG-1,3), monoacilglicerol (MAG), ácidos gordos livres (AGLs), fosfatidilcolina (FL) e padrão de colesterol (CT).

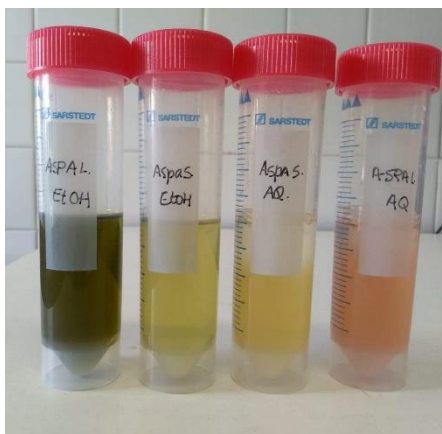
Foram aplicados 10 µl de cada *pool* e 10 µl de cada padrão na placa de sílica, previamente seca (110 °C) e arrefecida. A placa foi, posteriormente, colocada numa tina de eluição em contacto com uma fase móvel, previamente preparada, composta por hexano, éter e ácido fórmico (50:50:2). Após a fase móvel ter alcançado o limite da eluição, a placa foi deixada a secar durante 5 minutos e, seguidamente, pulverizada com uma solução de 10 % de ácido fosfomolibdico em etanol (p/v). Por fim, as placas foram deixadas, durante 15 min, no forno a 100 °C para revelação das bandas. A identificação das classes lipídicas teve por base a comparação visual com as bandas relativas aos padrões aplicados com recurso a um analisador de imagem integrado com o software

*Quantity One 1-D Analysis*, Bio-Rad (Hercules, USA) que permitiu, com base na área e densidade ótica de cada banda detetada, o cálculo das percentagens relativas das diferentes classes lipídicas identificadas.

### 3.2.3 Teor de polifenóis totais

#### **Preparação dos extratos**

Para a extração dos polifenóis totais, pesaram-se 1,25 g de biomassa de cada amostra em duplicado para preparação de extratos aquosos e etanólicos (5 % m/v), adicionando-se 25 ml de água ultra-pura e etanol (96 % v/v). De seguida, os tubos com as amostras foram homogeneizados durante 1 minuto a uma velocidade de 27000 - 30000 rpm com recurso a um Polytron (PT 10-35 GT, Kinematica, Switzerland) e, posteriormente, deixados durante a noite num agitador (400 rpm) à temperatura ambiente. No dia seguinte, procedeu-se a uma centrifugação (5 minutos, 5000 rpm a 4 °C) e o sobrenadante foi recolhido para novos tubos, **Figura 5**, cujo volume de 25 ml foi perfeito com água e etanol 96 %, tendo sido armazenados numa câmara frigorífica (2 °C) para posteriores análises.



**Figura 5:** Extratos aquosos e etanólicos das amostras  $F_0$  e  $L_0$  da *A. taxiformis*. Ana Sousa, Abril, 2019.

#### **Quantificação do teor de polifenóis totais**

Para a quantificação do teor em polifenóis totais (TPC), realizou-se um ensaio baseado na metodologia Singleton e Rossi (Singleton e Rossi, 1965) que recorre ao reagente Folin-Ciocalteu – este reagente, no estado não reduzido, apresenta uma cor amarela que, na presença de um agente redutor e em meio alcalino, é reduzido e adota uma cor azulada, permitindo a determinação do seu teor por leitura da absorvância. No ensaio realizado, adicionaram-se, em triplicado, 600 µl de água ultra-pura e 150 µl de reagente Folin-Ciocalteu diluído em água ultra-pura (1:1) a 100 µl de extrato. Depois de



terem sido deixados 5 minutos no escuro à temperatura ambiente, foram adicionados aos tubos 750 µl de solução de carbonato de sódio (2 % p/v) e deixados, uma vez mais, a reagir no escuro durante 1 hora e 30 minutos, à temperatura ambiente. No final, procedeu-se à leitura da absorvância a um comprimento de onda de 750 nm num espectrofotómetro UV-VIS (Helios Alpha model, Unicam, UK). Além dos extratos, foram preparados brancos com água ultra-pura e etanol 96 %.

O teor de compostos fenólicos totais foi expresso em equivalentes de ácido gálico (mg EAG/100 g peso seco) determinado com base numa curva de calibração de padrões de ácido gálico com concentrações compreendidas entre 0,010 – 0,300 mg/ml (Anexo I).

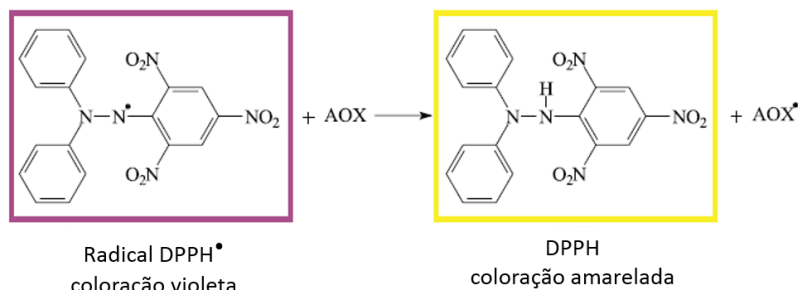
### 3.3 Análise das bioatividades

#### 3.3.1 Atividade antioxidante

Nos ensaios realizados para a determinação da atividade antioxidante, foram utilizados os mesmos extratos preparados em 3.2.3 e foram aplicadas 2 metodologias distintas: DPPH e ABTS.

##### **DPPH**

Neste ensaio, a atividade antioxidante dos extratos foi medida com base na sua capacidade de eliminação de radicais livres de uma solução metanólica do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), segundo a reação ilustrada na **Figura 6**. O DPPH é um radical livre estável que apresenta uma cor violeta que absorve num comprimento de onda de 517 nm e que, na presença de compostos dadores de átomos de hidrogénio, a sua forma reduzida passa a assumir uma cor amarelada que apresenta um valor de absorvância (a 517 nm) inferior (Miliauskas et al., 2004).



**Figura 6:** Reação química envolvida no ensaio de medição da atividade antioxidante através do método DPPH - ligação do eletrão desemparelhado do DPPH $\cdot$  ao átomo de hidrogénio do composto antioxidante (AOX). Adaptado de Becker et al. (2019).

Neste ensaio, 2 ml de uma solução metanólica de DPPH (0,15 mM) foram adicionados, em triplicado, a 1ml de extrato e deixados a reagir, no escuro, durante 30 minutos à temperatura ambiente. No final, a absorvância foi lida a um comprimento de onda de 517 nm no espectrofotômetro UV-VIS. É de referir que em todos os ensaios realizados, os extratos aquosos tiveram de ser centrifugados (5 minutos, 5 000 rpm a 4 °C) antes da leitura da absorvância uma vez que, após a reação com a solução de DPPH, se registou a formação de precipitados. Além dos extratos, foram preparados brancos com água ultra-pura e etanol 96 %.

A atividade de eliminação de radicais livres (% de inibição) foi determinada com base na **equação 5**:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{A0 - Aa}{A0} \times 100 \quad (5)$$

*Em que:*

*A0 – absorvância do branco*

*Aa – absorvância da amostra*

A atividade antioxidante foi expressa em miligramas de equivalentes de ácido ascórbico (mg EAA/ 100 g peso seco), determinada com base numa curva de calibração de padrões de ácido ascórbico com concentrações compreendidas entre 5 e 35 mg/L (**Anexo II**).

### **ABTS**

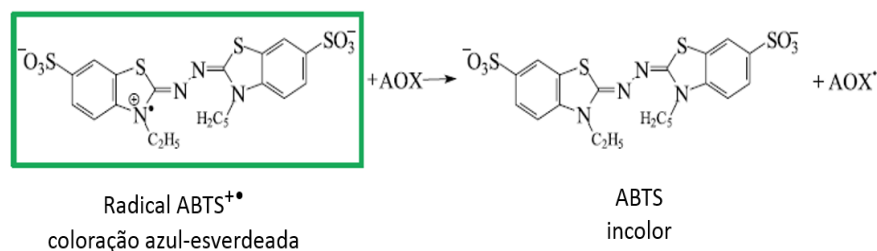
O ensaio da medição da atividade antioxidante através do método do ABTS (Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) foi realizado com base na metodologia descrita por Re et al. (1999). O ABTS, por ação química do persulfato de potássio, é previamente convertido no radical ABTS<sup>•+</sup> que apresenta uma coloração azul-esverdeada. Este método permite depois avaliar a capacidade dos extratos para converter o ABTS<sup>•+</sup> à sua forma reduzida ABTS, induzindo a perda de coloração da solução, tal como ilustrado na **Figura 7**. Por medição da absorvância e, com base na **equação 6**, determinou-se a percentagem de inibição de cada extrato.

$$\% \text{ Inibição} = \frac{A0 - Aa}{A0} \times 100 \quad (6)$$

*Em que:*

*A0 – absorvância do branco*

*Aa – absorvância da amostra*



**Figura 7:** Reação química envolvida no ensaio de medição da atividade antioxidante através do método ABTS – ação de neutralização do radical  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  pelo composto antioxidante (AOX). Adaptado de Becker et al. (2019).

Para a preparação do radical  $\text{ABTS}^{+\bullet}$ , 10 mg de ABTS foram dissolvidos em 2,6 ml de uma solução de persulfato de potássio (2,45 mM) e deixado a reagir durante 16 horas à temperatura ambiente, no escuro. Depois, esta solução com o  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  gerado foi diluída em tampão de fosfato de sódio (5 mM, pH 7,4) de forma a alcançar-se uma absorvância de  $0.70 \pm 0.02$  a 734 nm. Para o ensaio, adicionaram-se 2 ml da solução de  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  com a absorvância corrigida a 20  $\mu\text{l}$  de cada extrato e deixou-se incubar durante 6 minutos num banho a 30 °C, no escuro. Depois, procedeu-se à leitura da absorvância a 734 nm. Além dos extratos, foram preparados brancos com água ultra-pura e etanol 96 %. Os resultados foram expressos em mmol de equivalentes de trolox (mmol Etrolox/100 g peso seco), determinada com base numa curva de calibração de padrões de trolox com concentrações compreendidas entre 250 e 2500  $\mu\text{M}$  (**Anexo III**).

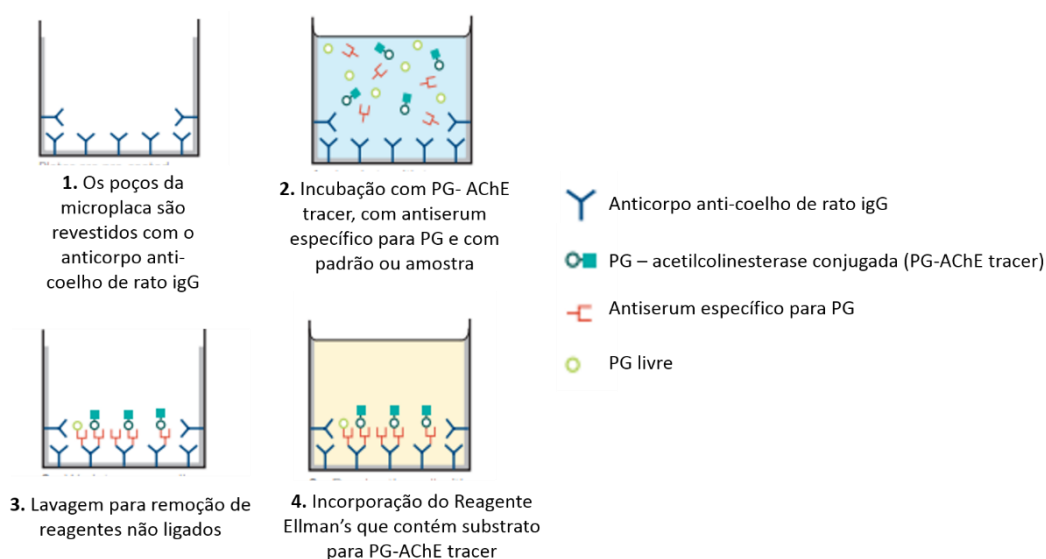
### 3.3.2 Atividade anti-inflamatória

#### **Preparação dos extratos**

Para os extratos da análise da atividade anti-inflamatória, pesaram-se 200 mg de biomassa de cada amostra em duplicado para a preparação de extratos aquosos e etanólicos, adicionando-se 2 ml de água ultra-pura e etanol (96% v/v). De seguida, os tubos com as amostras foram homogeneizados durante 1 minuto a uma velocidade de 30000 rpm com recurso a um Polytron (PT 10-35 GT, Kinematica, Switzerland). Após esta etapa, os tubos foram submetidos a um tratamento térmico, tendo sido deixados num banho a 80 °C durante 1 hora. Uma vez arrefecidos (30 minutos à temperatura ambiente), os tubos foram centrifugados (10 minutos, 5000 rpm a 4 °C) e os sobrenadantes foram recolhidos para balões pera previamente pesados. De seguida, o solvente foi evaporado num evaporador rotativo (60 °C, 175 mbar) e, após os balões pera com o resíduo terem sido pesados, os extratos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) para uma concentração final de 10 mg/ml (solução-mãe) e posteriores diluições para 1 mg/ml.

### Ensaio – método da inibição da ciclooxygenase (COX-2)

A atividade anti-inflamatória dos extratos foi avaliada com base na medição da sua ação inibitória sobre a enzima ciclooxygenase (COX-2) – esta é uma enzima bifuncional presente no organismo humano que converte o ácido araquidônico (substrato) em endoperoxido hidroperóxido (PGG<sub>2</sub>) e que o reduz ao álcool correspondente (PGH<sub>2</sub>), sendo este último um precursor de prostaglandinas (PGs), tromboxanos e prostaciclina – compostos envolvidos em reações inflamatórias. Este ensaio permite quantificar o teor de prostaglandina PG-F2 $\alpha$  que é gerada a partir do ácido araquidônico (AA, 20:4  $\omega$ 6), colocando os extratos a reagir com a ciclooxygenase. A quantificação das prostaglandinas é, posteriormente, realizada com recurso a um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), ilustrado na **Figura 8**, baseado na competição entre a PG-F2 $\alpha$  e a PG-acetilcolinesterase conjugada com um marcador (AChE-tracer) para um antissoro específico. A incorporação do reagente Ellman, que contém o substrato da AChE-tracer cujo produto de reação apresenta uma cor amarela, permite depois, através da medição da absorvância a 412 nm, quantificar a PG-F2 $\alpha$ .



**Figura 8:** Esquematisação do ensaio AChE ELISA. Adaptado de Cayman Chemical Company, 2018.

Para o ensaio, usou-se um kit enzimático comercial Cayman test kit-560131 (Cayman Chemical Company, USA).

Para cada ensaio, foram utilizados 10  $\mu$ l de cada extrato, 10  $\mu$ l de DMSO, 10  $\mu$ l de enzima COX-2 e 10  $\mu$ l de Heme (catalisador) em 160  $\mu$ l de tampão de reação. Foram depois adicionados 10  $\mu$ l de ácido araquidônico 10  $\mu$ M e cada reação foi deixada a incubar durante 2 min a 37 °C. Para parar a reação, foram adicionados 30  $\mu$ l de uma solução saturada de cloreto de estanho em ácido clorídico. Posteriormente, para realizar o ensaio ELISA, as misturas reacionais obtidas anteriormente no ensaio de inibição

foram diluídas em tampão ELISA em proporções de 1:2000 e 1:4000 relativamente às concentrações originais e utilizadas para incubação *overnight* na microplaca com agitação. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da COX-2.

### 3.4 Análise Estatística

A análise estatística do presente estudo foi realizada com o programa STATISTICA 7 (Stat-soft, Inc. USA, 2004).

A normalidade e a homogeneidade de variância dos resultados obtidos foram, respetivamente, verificadas com base na aplicação dos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Cochran C, Hartley, Bartlett.

Para a avaliação da existência de diferenças significativas entre as diferentes amostras a nível da composição proximal e de perfil de ácidos gordos foi aplicada uma distribuição *one-way ANOVA*, utilizando-se um teste de distribuição teste Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*).

Para a avaliação da existência de diferenças significativas entre as diferentes amostras a nível do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante (DPPH e ABTS) foi aplicada uma distribuição *ANOVA* fatorial, de modo a integrar o efeito do processo de secagem e da temperatura de armazenamento para cada momento temporal, e uma distribuição *one-way ANOVA* para avaliação do efeito do tempo para cada tipo de amostra (FA, FC, LA e LC), utilizando-se, para ambas, um teste de distribuição teste Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*). Para os resultados da atividade anti-inflamatória foram aplicadas as mesmas distribuições *ANOVA*, mas o teste utilizado foi o Tukey Unequal N HSD, dado existirem diferentes números de réplicas para as várias amostras. Para todos os testes estatísticos o nível de significância ( $\alpha$ ) foi 0,05.

Adicionalmente, foi investigada a possibilidade de existência de correlações entre teor de polifenóis totais e o teor de EPA e das bioatividades (antioxidante e anti-inflamatória) através da aplicação de uma regressão linear de acordo com o método dos mínimos quadráticos, realizada no programa Excel (Microsoft Office 365 ProPlus, 2018).

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Composição Proximal

Os resultados obtidos da composição proximal da *A. taxiformis* encontram-se apresentados na **Tabela 1**.

**Tabela 1: Composição proximal** (p/p.s.) da *A. taxiformis*. Os valores encontram-se apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão. Para cada coluna, valores com diferentes índices superiores (a-f) são estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

	Humidade (g/100 g p.s.)	Cinza (g/100 g p.s.)	Hidratos de Carbono (g/100 g p.s.)	Proteína (g/100 g p.s.)	Lípidos Totais (g/100 g p.s.)
F <sub>0</sub>	2,7 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	48,7 $\pm$ 0,0 <sup>bc</sup>	27,3 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	19,7 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	1,5 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
L <sub>0</sub>	5,6 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>	44,4 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	25,9 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	20,8 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>	3,4 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>
FA <sub>3</sub>	4,3 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	47,3 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	28,7 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	18,7 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,1 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
FC <sub>3</sub>	2,5 $\pm$ 0,0 <sup>d</sup>	49,5 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>	27,4 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	18,6 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	2,0 $\pm$ 0,7 <sup>ac</sup>
LA <sub>3</sub>	6,2 $\pm$ 0,0 <sup>e</sup>	45,6 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	25,7 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	19,7 $\pm$ 0,5 <sup>ab</sup>	2,8 $\pm$ 0,3 <sup>bc</sup>
LC <sub>3</sub>	5,0 $\pm$ 0,0 <sup>f</sup>	45,4 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	26,6 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	19,6 $\pm$ 0,5 <sup>ab</sup>	3,3 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>

F<sub>0</sub> e L<sub>0</sub> – amostras secas no forno (F) e liofilizadas (L), para o tempo inicial (t=0);

FA<sub>3</sub> e FC<sub>3</sub> – amostras secas no forno (F) armazenadas à temperatura ambiente (A) e à temperatura de congelação (C), para o tempo final (t=3);

LA<sub>3</sub> e LC<sub>3</sub> – amostras liofilizadas (L) armazenadas à temperatura ambiente (A) e à temperatura de congelação (C), para o tempo final (t=3).

O teor de humidade da *A. taxiformis*, no estado fresco, apresentou um valor estimado de cerca de 94 % do peso húmido (resultado não apresentado eshtimado com base na pesagem da amostra antes e após secagem) e os resultados após secagem mostram que a amostra sujeita à liofilização apresentou, para o tempo inicial, um teor de humidade (5,6 %) significativamente superior ao da amostra seca no forno (2,7 %). Este resultado é concordante com o que foi observado por Chan, Cheung e Ang (1997) - este estudo avaliou igualmente a influência do processo de secagem (forno (60 °C, 15 h) vs. liofilização (5 dias)) na macroalga castanha *S. hemiphyllum* e, após a secagem, a amostra liofilizada apresentou um teor de humidade significativamente superior ao da amostra seca no forno. No entanto, contrariamente, Nurshahida et al. (2018) também estudou o efeito do tratamento de secagem (forno (70 °C, 24 h) vs. liofilização (72 h)) na composição proximal da macroalga vermelha *K. alvarezii* e registaram um teor de humidade significativamente superior nas amostras secas no forno.

Ao fim de três meses, o teor de humidade, para ambos tipos de secagem, apresentou diferenças significativas face ao registado para o tempo inicial - as amostras

deixadas à temperatura ambiente apresentaram um aumento significativo (de 2,7 para 4,3 % nas amostras secas no forno e de 5,6 para 6,2 % nas amostras liofilizadas) enquanto que as amostras armazenadas congeladas apresentaram uma descida significativa (de 2,7 para 2,5 % nas amostras secas no forno e de 5,6 para 5,0 % nas amostras liofilizadas). Estas variações podem ser justificadas pela própria heterogeneidade associada à morfologia da alga – as macroalgas são constituídas por uma parte ereta que inclui a lâmina e a estipe e por um órgão de fixação de maior ou menor dimensão com mais ou menos filamentos (Pereira, 2009). Tendo a alga sido congelada sob a forma fresca e não ter sido sujeita a nenhum processo de homogeneização prévio e, uma vez que as análises realizadas tiveram sempre por base diferentes frações para diferentes amostras, é expectável que exista algum nível de heterogeneidade associada à sua morfologia que se reflete, assim, na sua composição.

Em termos da cinza, os resultados obtidos mostraram que esta constitui a principal componente da matéria seca da *A. taxiformis*, tendo sido registado um teor mínimo de cerca de 44% e um máximo de quase 50 %. Estes valores foram o dobro dos obtidos por Nunes et al. (2017) para a *A. taxiformis* (liofilizada). O teor de cinza em  $F_0$  (48,7 %) apresentou um valor significativamente superior ao registado em  $L_0$  (44,4 %) o que complementa de forma consistente o menor teor de humidade observado na primeira. No entanto, Chan, Cheung e Ang (1997), apesar de também ter registado um teor de humidade inferior na *S. hemiphyllum* seca no forno, observaram um teor de cinza significativamente superior na amostra liofilizada. De acordo com os resultados obtidos, o teor de cinza não parece ter sido afetado ao longo dos 3 meses de armazenamento uma vez que as variações registadas não foram significativas em nenhuma das condições aplicadas. No entanto, para os casos de  $FA_3$  (47,3 %) e  $FC_3$  (49,5 %), registou-se uma diferença significativa que poderá ser justificada, uma vez mais, pela heterogeneidade das amostras já referida acima.

O teor de hidratos de carbono variou, aproximadamente, entre os 26 e os 29 % não tendo sido verificadas diferenças significativas entre as amostras pelo que, ao fim de três meses, este grupo molecular não parece ter sido influenciado pelas condições de secagem e armazenamento aplicadas. Nurshahida et al. (2018) não registou diferenças significativas no teor de hidratos de carbono entre os dois métodos de secagem na macroalga *K. alvarezii*. Já Chan, Cheung e Ang (1997) não registou diferenças significativas no teor de fibra total entre a secagem em forno e a liofilização para a *S. hemiphyllum*. É de referir que foi quantificado um teor de fibra (solúvel + insolúvel) na amostra liofilizada inicial ( $L_0$ ) de cerca de 20 % (valor próximo dos 22 % obtidos por El-Baroty et al. (2007), revelando que a fibra constitui uma grande porção

do grupo dos hidratos de carbono da *A. taxiformis*. A fração minoritária restante deverá ser constituída por alguns açúcares mais simples como manitol e alguns açúcares de reserva como o amido florideano tal como sugerido por Holdt e Kraan (2011).

No que diz respeito à proteína, os teores registados variaram, aproximadamente, entre os 19 e os 21%, valores concordantes com os obtidos por Roque et al. (2018). Apesar de não ter havido uma variação significativa nem ao fim dos 3 meses, nem entre o armazenamento à temperatura ambiente e à temperatura de congelação, o teor proteico das amostras L<sub>0</sub> (20,8 %) foi superior ao das amostras F<sub>0</sub> (19,7 %), FA<sub>3</sub> (18,7 %) e FC<sub>3</sub> (18,6 %), sugerindo que as condições aplicadas no processo de secagem no forno parecem ter tido algum efeito de degradação neste grupo molecular. Contrariamente, Nurshahida et al. (2018) registou um teor proteico significativamente superior nas amostras de *K. alvarezii* sujeitas à secagem no forno, comparativamente com as liofilizadas. Já Wong e Cheung (2001), que também estudou o efeito do tratamento de secagem (secagem em forno vs. liofilização) na componente proteica de 3 espécies de macroalgas castanhas, verificaram diferenças significativas do teor proteico entre espécies, mas não entre métodos de secagem. No entanto, a secagem no forno deste estudo foi realizada num equipamento com circulação de ar e, apesar da temperatura aplicada ter sido a mesma à do presente trabalho, o período de exposição foi mais de 3 vezes inferior. De acordo com Chan, Cheung e Ang (1997), o processo de secagem também não refletiu diferenças significativas no teor proteico de *S. hemiphyllum*.

Por fim, o teor de lípidos totais representou o grupo de macronutrientes minoritário tendo o teor máximo registado não ultrapassado os 3,5 %. O teor de gordura das amostras liofilizadas apresentou valores significativamente superiores ao das amostras secas no forno e não se verificaram, para nenhum dos casos, diferenças significativas ao fim de três meses entre o armazenamento à temperatura ambiente e à temperatura de congelação. Contrariamente, Chan, Cheung e Ang (1997) não verificaram diferenças significativas no teor de gordura entre os dois métodos de secagem e Nurshahida et al. (2018) observaram a situação contrária para o caso da *K. alvarezii* – registaram um teor de gordura significativamente superior nas amostras secas no forno, comparativamente com as liofilizadas.

É importante referir que o teor de lípidos totais obtido para as amostras liofilizadas poderá estar sobrevalorizado uma vez que, neste caso, a extração poderá ter sido maior - as amostras liofilizadas, depois de trituradas, apresentaram uma textura mais fina do que as secas no forno pelo que, aplicando as mesmas condições experimentais, poderá ter ocorrido extração de outros compostos lipofílicos, tais como



alguns pigmentos, que poderão ter contribuído para a sobrestimação do teor de gordura – este método de determinação da gordura implementado e adaptado para outras macroalgas já anteriormente estudadas teria de ser otimizado para esta alga. Além disto, procedeu-se à separação das classes lipídicas das amostras por TLC (os resultados obtidos encontram-se apresentados no **Anexo IV**), tendo sido observado, para as amostras liofilizadas, uma menor intensidade em algumas bandas e, inclusivamente, a total ausência de outras, comparativamente com as amostras secas no forno. Com base nestes resultados poder-se-á deduzir a provável presença de outros compostos para além da gordura nos extratos das amostras liofilizadas e que, desta forma, a suposta concentração de 10 mg de gordura/ml da qual se partiu para esta cromatografia, poderá corresponder, na realidade, a um teor inferior.

## 4.2 Perfil de Ácidos Gordos

Os resultados do perfil de ácidos gordos da *A. taxiformis* encontram-se apresentados na **Tabela 2**. Verificou-se que os ácidos gordos saturados constituíram o grupo mais abundante (76,2-93,1 %), seguido dos grupos dos monoinsaturados (4,4-11,0 %) e dos polinsaturados (0,3 – 11,5 %). Estes resultados foram concordantes com o perfil de ácidos gordos das amostras liofilizadas de *A. taxiformis* observado por Ragonese et al. (2014) - registou um teor de SFAs de 75 %, seguido de um teor de MUFAs de 20% e um teor minoritário de PUFA de cerca de 2 %. Também um tipo de perfil similar foi verificado para amostras liofilizadas de *A. armata* num estudo realizado por Pereira et al. (2012) o qual registou, igualmente, um teor maioritário de SFAs (81 %) seguido dos grupos MUFAs (14 %) e PUFA (5 %). No entanto, Mellouk et al. (2017) registou uma composição distinta em amostras de *A. taxiformis* secas no escuro à temperatura ambiente durante 3 dias: neste estudo, os PUFA representaram o grupo maioritário (51 %), seguido dos SFAs (23 %) e dos MUFAs (17 %).

**Tabela 2: Composição de ácidos gordos** (% de ácidos gordos totais e em mg/100 g p.s.) da *A. taxiformis*. Os valores encontram-se apresentados sob a forma de média ± desvio padrão. Para cada linha, valores com diferentes índices superiores (a-f) são estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

	<b>F<sub>0</sub></b>		<b>L<sub>0</sub></b>		<b>FA<sub>3</sub></b>		<b>FC<sub>3</sub></b>		<b>LA<sub>3</sub></b>		<b>LC<sub>3</sub></b>	
<b>Ácido Gordo</b>	<b>%</b>	<b>mg/100 g p.s.</b>	<b>%</b>	<b>mg/100 g p.s.</b>	<b>%</b>	<b>mg/100 g p.s.</b>	<b>%</b>	<b>mg/100 g p.s.</b>	<b>%</b>	<b>mg/100 g p.s.</b>	<b>%</b>	<b>mg/100 g p.s.</b>
14:0	17,0±0,2 <sup>a</sup>	116,1±12,3 <sup>AB</sup>	15,6±1,0 <sup>a</sup>	98,6±12,5 <sup>A</sup>	18,2±2,3 <sup>a</sup>	147,4±53,2 <sup>AB</sup>	17,8±2,1 <sup>a</sup>	206,5±55,6 <sup>B</sup>	16,4±1,2 <sup>a</sup>	130,9±22,7 <sup>AB</sup>	16,2±1,3 <sup>a</sup>	114,9±36,6 <sup>A</sup>
16:0	59,8±0,6 <sup>ab</sup>	408,3±46,8 <sup>A</sup>	57,1±2,3 <sup>a</sup>	375,5±56,7 <sup>A</sup>	66,8±1,3 <sup>cd</sup>	528,1±128,0 <sup>AB</sup>	63,1±0,8 <sup>bd</sup>	721,2±121,5 <sup>B</sup>	71,8±3,6 <sup>c</sup>	570,7±86,7 <sup>AB</sup>	69,5±1,5 <sup>c</sup>	487,4±121,4 <sup>AB</sup>
18:0	1,3±0,0 <sup>a</sup>	8,7±0,7 <sup>A</sup>	1,3±0,0 <sup>ab</sup>	8,8±0,8 <sup>A</sup>	1,4±0,2 <sup>abc</sup>	11,1±1,9 <sup>AB</sup>	1,3±0,1 <sup>a</sup>	14,2±0,7 <sup>B</sup>	1,7±0,0 <sup>c</sup>	13,3± 1,0 <sup>B</sup>	1,6±0,2 <sup>bc</sup>	11,3±1,8 <sup>AB</sup>
<b>ΣSFA</b>	81,8±1,3 <sup>ab</sup>	559,2±67,2 <sup>A</sup>	76,2±3,2 <sup>a</sup>	501,5±77,3 <sup>A</sup>	88,1±1,0 <sup>bc</sup>	700,4±187,4 <sup>AB</sup>	86,1± 3,1 <sup>bc</sup>	988,3±189,4 <sup>B</sup>	93,1±3,8 <sup>c</sup>	739,5±105,8 <sup>AB</sup>	89,2±1,8 <sup>c</sup>	625,1±155,7 <sup>A</sup>
16:1 ω9	1,9±0,1 <sup>bc</sup>	12,7±1,2 <sup>A</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>B</sup>	2,1±0,2 <sup>c</sup>	16,6±3,2 <sup>A</sup>	1,6±0,3 <sup>b</sup>	19,2±6,6 <sup>A</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>B</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>B</sup>
17:1	0,6±0,0 <sup>ab</sup>	3,9±0,5 <sup>AB</sup>	1,1±0,5 <sup>ab</sup>	7,1±2,8 <sup>AB</sup>	0,23±0,39 <sup>a</sup>	1,3±2,3 <sup>A</sup>	0,38±0,38 <sup>a</sup>	3,7±3,7 <sup>AB</sup>	0,7±0,7 <sup>ab</sup>	4,5±4,5 <sup>AB</sup>	1,6±0,16 <sup>b</sup>	10,8±1,8 <sup>B</sup>
18:1 ω9	4,5±0,2 <sup>a</sup>	30,4±2,2 <sup>AB</sup>	4,0±0,1 <sup>ab</sup>	26,3±2,4 <sup>AB</sup>	3,6±0,3 <sup>be</sup>	28,1±5,3 <sup>AB</sup>	3,1±0,5 <sup>de</sup>	34,4±0,3 <sup>B</sup>	2,8±0,3 <sup>cd</sup>	22,5±4,6 <sup>AC</sup>	2,1±0,3 <sup>c</sup>	14,8±4,9 <sup>C</sup>
18:1 ω7	1,5±0,1 <sup>ab</sup>	10,1±0,3 <sup>ABC</sup>	2,1±0,4 <sup>b</sup>	13,5±1,8 <sup>A</sup>	1,18±0,11 <sup>ab</sup>	9,2±1,6 <sup>ABC</sup>	1,0± 0,2 <sup>a</sup>	11,0±0,2 <sup>AC</sup>	0,5±0,5 <sup>a</sup>	3,9±3,9 <sup>B</sup>	0,6±0,5 <sup>a</sup>	4,6±4,1 <sup>BC</sup>
<b>ΣMUFA</b>	11,0±0,4 <sup>a</sup>	74,7±5,7 <sup>A</sup>	9,8±1,5 <sup>ab</sup>	63,8±5,4 <sup>A</sup>	8,7±0,9 <sup>ab</sup>	67,8±11,6 <sup>A</sup>	7,7±0,9 <sup>bd</sup>	86,4±3,9 <sup>A</sup>	4,4±1,2 <sup>c</sup>	33,4±6,3 <sup>B</sup>	5,2±1,0 <sup>cd</sup>	37,6±15,5 <sup>B</sup>
20:4 ω6	0,5±0,1 <sup>a</sup>	3,7±0,2 <sup>B</sup>	1,7±0,4 <sup>b</sup>	11,1±1,7 <sup>C</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>A</sup>	0,2±0,2 <sup>a</sup>	1,9±1,9 <sup>A B</sup>	0,1±0,1 <sup>a</sup>	1,0±1,0 <sup>AB</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>A</sup>
20:5 ω3	1,9±0,2 <sup>a</sup>	12,7±0,2 <sup>B</sup>	8,6±1,7 <sup>b</sup>	55,5±4,9 <sup>A</sup>	0,3±0,6 <sup>a</sup>	1,9±3,3 <sup>B</sup>	0,7±0,7 <sup>a</sup>	6,4±6,4 <sup>B</sup>	0,3±0,3 <sup>a</sup>	2,4±2,4 <sup>B</sup>	1,0±0,9 <sup>a</sup>	7,1±6,3 <sup>B</sup>
<b>ΣPUFA</b>	3,0±0,4 <sup>a</sup>	19,8±0,4 <sup>A</sup>	10,5±2,5 <sup>b</sup>	67,9±8,4 <sup>B</sup>	0,3±0,6 <sup>a</sup>	1,9±3,3 <sup>A</sup>	1,1±1,1 <sup>a</sup>	10,1±10,1 <sup>A</sup>	1,9±1,9 <sup>a</sup>	13,7±13,7 <sup>A</sup>	1,0±0,9 <sup>a</sup>	7,1±6,3 <sup>A</sup>
w3	1,9±0,2 <sup>a</sup>	12,7±0,2 <sup>B</sup>	8,6±1,7 <sup>b</sup>	55,4±4,9 <sup>A</sup>	0,3±0,6 <sup>a</sup>	1,9±3,3 <sup>B</sup>	0,7±0,7 <sup>a</sup>	6,4±6,4 <sup>B</sup>	0,3±0,3 <sup>a</sup>	2,4±2,4 <sup>B</sup>	1,0±0,9 <sup>a</sup>	7,1±6,3 <sup>B</sup>
w6	1,0±0,2 <sup>ab</sup>	7,0±0,5 <sup>AB</sup>	1,9±0,9 <sup>b</sup>	12,4±3,6 <sup>B</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>A</sup>	0,3±0,3 <sup>ab</sup>	2,8±2,8 <sup>AB</sup>	1,4±1,4 <sup>ab</sup>	10,0±10,0 <sup>AB</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>A</sup>
<b>NI</b>	4,3±0,5	29,1±0,3	2,7±0,3	17,3±2,3	2,8±0,7	23,2±10,8	5,2±1,2	56,7±4,8	1,9±1,9	13,3±13,3	4,1±0,8	29,3±10,4

**F<sub>0</sub> e L<sub>0</sub>** – amostras secas no forno (F) e liofilizadas (L), para o tempo inicial (t=0); **FA<sub>3</sub> e FC<sub>3</sub>** – amostras secas no forno (F) armazenadas à temperatura ambiente (A) e à temperatura de congelação (C), para o tempo final (t=3); **LA<sub>3</sub> e LC<sub>3</sub>** - amostras liofilizadas (L) armazenadas à temperatura ambiente (A) e à temperatura de congelação (C), para o tempo final (t=3); **NI** – ácidos gordos não identificados

Começando pelo grupo dos ácidos gordos polinsaturados, o ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5  $\omega$ 3), único PUFA com ligação dupla em posição  $\omega$ 3 encontrado no perfil de ácidos gordos da *A. taxiformis*, e o ácido araquidónico (AA; 20:4  $\omega$ 6) foram os mais abundantes, tal como, uma vez mais, verificado por Pereira et al. (2012) para *A. armata*. O ácido araquidónico (AA) apresentou um teor significativamente inferior na amostra seca no forno  $F_0$  (0,5 %) comparativamente com o registado na amostra liofilizada  $L_0$  (1,7 %). Ao fim de três meses, os teores de AA registados para as amostras  $LA_3$  (0,1 %) e  $LC_3$  (0,0 %) foram significativamente inferiores ao registado em  $L_0$ ; as amostras secas no forno,  $FA_3$  e  $FC_3$ , apresentaram, respetivamente, teores de 0,0 e 0,2 %. No que diz respeito ao ácido eicosapentanoico (EPA), à semelhança do que foi observado para o AA, o teor registado em  $F_0$  (1,9 %) foi significativamente inferior ao registado em  $L_0$  (8,6 %). Também, ao fim de três meses, os teores de EPA registados para as amostras  $LA_3$  (0,3 %) e  $LC_3$  (1,0 %) foram significativamente inferiores ao registado em  $L_0$ ; as amostras secas no forno,  $FA_3$  e  $FC_3$ , apresentaram, respetivamente, teores de 0,3 e 0,7 %. Os resultados obtidos para o teor total de PUFA's refletiram o que foi já analisado anteriormente para os dois ácidos gordos polinsaturados: a amostra  $F_0$  apresentou um teor total de 3,0% (20mg/100g), significativamente inferior ao observado na amostra  $L_0$ , 10,5% (68 mg/100g); as amostras liofilizadas  $LA_3$ , 1,9 % (13,7 mg/100 g) e  $LC_3$ , 1,0 % (7,1 mg/100 g) apresentaram teores significativamente inferiores ao de  $L_0$  e as amostras secas no forno,  $FA_3$  e  $FC_3$ , apresentaram, respetivamente, teores de 0,3 % (1,9 mg/100 g) e 1,1 % (10,1 mg/100 g). Estes resultados permitiram mostrar, desde logo, que, comparativamente com o processo de liofilização, o processo de secagem no forno produziu uma degradação significativa dos PUFA's que vai ao encontro do que foi observado por Chan, Cheung e Ang (1997) para a macroalga *S. hemiphyllum* - registaram uma proporção total de PUFA's significativamente superior nas amostras liofilizadas, comparativamente com as amostras secas no forno. Depois, ficou demonstrado também que o fator *tempo* teve uma influência significativa na degradação destes ácidos gordos e, em nenhuma das duas temperaturas de armazenamento, se observou uma preservação da biomassa. Schmid, Guihéneuf e Stengel (2016) também estudou, ao longo de 1, 3 e 22 meses, o efeito da temperatura (temperatura ambiente: 18-20 °C; temperatura de refrigeração: 4 °C; temperatura de congelação: -20 °C) no perfil de ácidos gordos de amostras liofilizadas da macroalga vermelha *P. Palmata* e observaram que a temperatura e o tempo de armazenamento tiveram uma influência significativa nos seus níveis de ácidos gordos: à temperatura ambiente, o teor total de ácidos gordos sofreu reduções significativas ao fim de 1, 3 e 22 meses, em particular o teor de EPA que, ao fim de 22 meses, apresentou 1/5 do teor inicial; à temperatura de refrigeração, verificaram um decréscimo significativo do teor total de ácidos gordos ao

fim de 3 e de 22 meses. destacando-se uma vez mais o decréscimo de EPA que produziu uma redução significativa nos níveis de PUFA's; no entanto, à temperatura de congelação, os níveis de SFAs, MUFA's e PUFA's mantiveram-se estáveis ao fim dos 22 meses de estudo, mostrando que o armazenamento desta macroalga por períodos mais extensos poderá ser feito sob estas condições de temperatura sem risco de degradação do perfil de ácidos gordos. Relativamente ao rácio  $\omega 3:\omega 6$ , observou-se, para  $t=0$ , uma proporção respetiva de, aproximadamente, 2:1 e de 4:1 em F e L, refletindo, uma vez mais, o maior efeito degradativo do PUFA  $\omega 3$  nas amostras submetidas à secagem no forno.

Olhando agora para a composição em termos de MUFA's, detetou-se, desde logo, a presença do ácido gordo 16:1  $\omega 9$  nas amostras secas no forno e a ausência do mesmo nas amostras liofilizadas. Este ácido gordo, que apresentou na amostra  $F_0$  um teor de 2%, poderá constituir um produto de degradação/transformação de outros ácidos gordos que terão sofrido deterioração. O ácido oleico (18:1  $\omega 9$ ) apresentou um teor inicial de 4,5 % na amostra  $F_0$ , tendo sofrido, ao fim dos 3 meses, um decréscimo significativo para os 3,6 e 3,1 % em  $FA_3$  e  $FC_3$ , respetivamente; nas amostras liofilizadas, o comportamento deste ácido gordo ao longo do tempo foi similar, tendo sido registado um teor inicial em  $L_0$  de 4,0 % e de 2,8 e 2,1 % em  $LA_3$  e  $LC_3$ , respetivamente. Já o ácido gordo 18:1  $\omega 7$  permaneceu estável nas amostras secas no forno com uma percentagem compreendida entre 1,0-1,5 % enquanto que, nas amostras liofilizadas, se verificou uma redução significativa de 2,1 % em  $L_0$  para, respetivamente, 0,5 e 0,6 % em  $LA_3$  e  $LC_3$ . No que diz respeito ao teor total de MUFA's, as amostras secas no forno partiram de um teor de 11,0% (74,7 mg/100 g) para teores finais de 8,7% (67,8 mg/100 g) em  $FA_3$  e de 7,7 % (86,4 mg/100 g) em  $FC_3$ . Em termos de valores percentuais, o teor em  $FC_3$  foi estatisticamente inferior ao registado em  $F_0$  embora o teor absoluto não reflita esta diferença. Para as amostras liofilizadas,  $L_0$  registou um teor de 9,8 % (63,8 mg/100 g) que sofreu uma redução significativa ao fim dos 3 meses, apresentando teores de 4,4 % (33,4 mg/100 g) e de 5,2 % (37,6 mg/100 g) em  $LA_3$  e  $LC_3$ , respetivamente. Estes resultados mostraram que os MUFA's, apesar de se terem comportado de forma similar aos PUFA's em termos de evolução ao longo do tempo, não apresentaram, contudo, o mesmo contraste entre os dois processos de secagem. Também no estudo de Chan, Cheung e Ang (1997) se verificou que o processo de secagem no forno não produziu um nível de degradação no teor de MUFA's de *S. hemiphyllum* tão acentuado como o verificado no teor de PUFA's (para as amostras secas no forno e liofilizadas o teor de MUFA's foi, respetivamente, 20 % e 19 % enquanto que o teor de PUFA's apresentou um valor de 34 e 40 %, respetivamente).

Por fim, analisando o grupo dos SFAs, verificou-se que o ácido palmítico (16:0) constituiu o ácido gordo mais abundante da *A. taxiformis* – apresentou, respetivamente, um teor de 60 e de 57 % nas amostras  $F_0$  e  $L_0$ . Verificou-se um aumento do teor deste ácido gordo saturado na amostra  $FA_3$  para cerca de 67 % tal como sucedido para as amostras  $LA_3$  (71,8 %) e  $LC_3$  (69,5 %). O ácido mirístico (14:0) foi o segundo ácido gordo mais abundante com teores respetivos iniciais de 17,0 e de 15,6 % para as amostras  $F_0$  e  $L_0$ , mantendo-se estável ao longo dos 3 meses para ambas condições de armazenamento. O teor total em SFAs foi de cerca de 82% (559 mg/100 g) em  $F_0$  e de 76 % (502 mg/100 g) em  $L_0$ . No que diz respeito às amostras liofilizadas, este grupo de ácidos gordos sofreu, em valor percentual, um aumento significativo para 93 % (740 mg/100 g) e 89 % (625 mg/100 g) em  $LA_3$  e  $LC_3$ , respetivamente. Chan, Cheung e Ang (1997) registaram uma proporção de ácidos gordos saturados significativamente inferior nas amostras liofilizadas, comparativamente com as amostras secas no forno (que refletiu a proporção significativamente superior de ácidos gordos insaturados nas primeiras) e, embora, neste caso, não se tenha verificado diferenças significativas no teor total de SFAs entre as amostras iniciais,  $F_0$  e  $L_0$ , as amostras liofilizadas, por apresentarem um nível de degradação inferior face às amostras secas no forno, a sua margem de degradação temporal poderá ter sido maior, daí o aumento da proporção de ácidos gordos saturados ao fim dos três meses.

Os lípidos constituem um grupo molecular bastante propenso a sofrer oxidação tornando a degradação da componente lipídica dos alimentos numa das principais preocupações no que diz respeito ao seu armazenamento e conservação. Um dos mecanismos pelo qual os lípidos e, em particular os ácidos gordos, podem sofrer degradação oxidativa é a autooxidação. Este processo envolve uma complexa cadeia de reações de radicais livres que se inicia com uma reação endotérmica na qual ocorre a remoção espontânea de um átomo de hidrogénio da cadeia de um ácido gordo, originando um radical lipídico – fatores como o calor ou a luz visível e ultravioleta podem acelerar a formação destes radicais livres. A energia necessária para remover um átomo de hidrogénio de uma cadeia de ácido gordo depende da sua posição na estrutura da molécula: os átomos de hidrogénio que se encontram ligados aos átomos de carbono envolvidos numa dupla ligação, por apresentarem uma energia de dissociação menor, são mais facilmente removidos, o que pode explicar o maior grau de degradação observado nos PUFA's comparativamente com os MUFA's e SFAs. O radical lipídico formado pode reagir depois com o oxigénio atmosférico dando origem a uma nova espécie de radical livre - radical peróxido, que, por sua vez, pode desencadear um fenómeno de propagação de peroxidação lipídica por reação com outros lípidos

adjacentes, formando os lípidos hidroperóxidos e outro radical lipídico (Choe e Min, 2006a). Tal como já referido, a temperatura é um dos fatores que tem influência direta na taxa de degradação da fração lipídica, estando demonstrado que a autooxidação e a decomposição dos hidroperóxidos aumenta com o aumento da temperatura (Shahidi e Spurvey, 1996), o que pode explicar, por um lado, o facto da secagem no forno se ter revelado como o processo mais agressivo no que diz respeito à degradação dos ácidos gordos insaturados. No entanto, por outro lado, o armazenamento à temperatura de congelação não pareceu impedir ou atrasar a deterioração dos PUFA's da *A. taxiformis*, uma vez que, mesmo nas amostras liofilizadas, ao fim de 3 meses, o decréscimo destes ácidos gordos foi evidente.

É importante referir ainda que a presença de compostos com atividade antioxidante pode ter também influência no nível de oxidação dos ácidos gordos, uma vez que, agindo como dadores de átomos de hidrogénio, estes compostos podem bloquear ou retardar a cadeia de reações descrita anteriormente (Choe e Min, 2009).

É de referir que os resultados obtidos relativos à composição proximal e à fração lipídica da *A. taxiformis* constaram na apresentação de um *poster* submetido para o 49º congresso WEFTA (**Anexo V**).

### 4.3 Teor de Polifenóis Totais (TPC)

O teor de polifenóis totais (TPC) dos extratos etanólicos e aquosos da *A. taxiformis* encontra-se apresentado, respetivamente, nas **Tabelas 3 e 4**.

Começando pelos extratos etanólicos, de uma forma geral, o teor de polifenóis totais apresentou um comportamento-padrão ao longo dos três meses de estudo: inicialmente, verificou-se um TPC significativamente superior nas amostras liofilizadas (94,4 mg EAG/100 g p.s.) comparativamente com o valor registado para as amostras secas no forno (75,2 mg EAG/100 g p.s.). Esta diferença significativa entre o processo de secagem no forno vs. liofilização foi igualmente observada ao longo dos três meses de estudo. A degradação que terá ocorrido nas amostras secas no forno (60 °C, 72 h) poderá ser explicada pelo facto dos processos de secagem intensos e/ou prolongados geralmente produzirem perdas significativas nos compostos de natureza antioxidante e termodegradável, nomeadamente os polifenóis, naturalmente presentes na matéria prima fresca (**Lim e Murtijaya, 2007**). Ao fim de um mês, todas as amostras sofreram um decréscimo significativo do TPC: FA e FC apresentaram, respetivamente, um teor de 50,2 e 48,6 mg EAG/100 g p.s. e LA e LC apresentaram, respetivamente, um teor de 63,0 e 63,7 mg EAG/100 g p.s. Para os restantes meses de estudo de conservação, o

TPC não sofreu variações significativas. Relativamente ao efeito da temperatura de armazenamento, este fator parece não ter produzido qualquer variação significativa no teor desta classe de compostos bioativos.

**Tabela 3: Teor de polifenóis totais** (mg EAG/100 g p.s.) dos **extratos etanólicos** da *A. taxiformis*. Os valores encontram-se apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão. Para cada linha, valores com diferentes índices superiores (a-f) são estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ); para cada coluna, valores com diferentes índices superiores (w-z) são estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

tempo (mês)	FA	FC	LA	LC
0	75,2 $\pm$ 1,0 <sup>aw</sup>	75,2 $\pm$ 1,0 <sup>aw</sup>	94,4 $\pm$ 3,9 <sup>bw</sup>	94,4 $\pm$ 3,9 <sup>bw</sup>
1	50,2 $\pm$ 4,0 <sup>ax</sup>	48,6 $\pm$ 0,8 <sup>ax</sup>	63,0 $\pm$ 1,4 <sup>bx</sup>	63,7 $\pm$ 1,8 <sup>bx</sup>
2	47,1 $\pm$ 0,5 <sup>ax</sup>	46,8 $\pm$ 0,6 <sup>ax</sup>	68,6 $\pm$ 2,5 <sup>bx</sup>	66,5 $\pm$ 2,0 <sup>bx</sup>
3	49,4 $\pm$ 1,4 <sup>ax</sup>	47,3 $\pm$ 0,8 <sup>ax</sup>	63,5 $\pm$ 1,6 <sup>bx</sup>	62,4 $\pm$ 1,0 <sup>bx</sup>

**FA e FC** - amostras secas no forno (F) armazenadas à temperatura ambiente (A) e à temperatura de congelação (C);  
**LA e LC** - amostras liofilizadas (L) armazenadas à temperatura ambiente (A) e à temperatura de congelação (C).

No que diz respeito ao processo de secagem, o estudo de Le Lann, Jégou e Stiger-Pouvreau (2008) com extratos de metanol/água de duas macroalgas castanhas mostrou resultados semelhantes – procurou-se comparar o efeito de diferentes métodos de conservação na preservação da biomassa das macroalgas *S. muticum* e *B. bifurcata*, aplicando métodos de secagem solar em estufa (72 h), forno de ar quente (50-60 °C, 40 h), liofilização (72 h) e armazenamento à temperatura de congelação (-20 °C, 3 semanas), tendo sido verificado, por um lado, um TPC significativamente superior nas amostras liofilizadas comparativamente com as amostras secas no forno e, por outro, a ausência de diferenças significativas entre as amostras liofilizadas, as amostras congeladas durante três semanas e as amostras no estado fresco. Também Wong e Cheung (2001) mostrou resultados concordantes com extratos de água/acetona: amostras liofilizadas de três macroalgas castanhas do género *Sargassum* apresentaram teores de polifenóis totais significativamente superiores ao das amostras secas no forno. Contrariamente, Ling et al. (2014) observou, para extratos metanólicos da macroalga vermelha *K. alvarezii*, um TPC e TFC significativamente superior em amostras secas no forno (80 °C, 24 h) comparativamente com macroalgas liofilizadas.

Analisando agora os extratos aquosos, a evolução do TPC, em função das várias variáveis em estudo, apresentou um comportamento diferente do que foi observado nos extratos etanólicos. Inicialmente, os resultados dos diferentes extratos foram concordantes entre si – as amostras liofilizadas (104 mg EAG/100 g p.s.) apresentaram

um TPC significativamente superior ao das amostras secas no forno (93 mg EAG/100 g p.s.).

**Tabela 4: Teor de polifenóis totais** (mg EAG/100 g p.s.) dos **extratos aquosos** da *A. taxiformis*. Os valores encontram-se apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão. Para cada linha, valores com diferentes índices superiores (a-f) são estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ); para cada coluna, valores com diferentes índices superiores (w-z) são estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

tempo(mês)	FA	FC	LA	LC
0	93,2 $\pm$ 4,0 <sup>aw</sup>	93,2 $\pm$ 4,0 <sup>aw</sup>	104 $\pm$ 4 <sup>bw</sup>	104 $\pm$ 4 <sup>bw</sup>
1	101 $\pm$ 3 <sup>awx</sup>	101 $\pm$ 4 <sup>aw</sup>	105 $\pm$ 4 <sup>aw</sup>	108 $\pm$ 3 <sup>aw</sup>
2	131 $\pm$ 3 <sup>ay</sup>	138 $\pm$ 7 <sup>ax</sup>	133 $\pm$ 5 <sup>ax</sup>	154 $\pm$ 4 <sup>bx</sup>
3	119 $\pm$ 8 <sup>axy</sup>	144 $\pm$ 0,0 <sup>bcx</sup>	152 $\pm$ 8 <sup>cy</sup>	125 $\pm$ 5 <sup>aby</sup>

**FA e FC** - amostras secas no forno (F) armazenadas à temperatura ambiente (A) e à temperatura de congelação (C);  
**LA e LC** - amostras liofilizadas (L) armazenadas à temperatura ambiente (A) e à temperatura de congelação (C).

No entanto, ao fim de dois meses todas as amostras apresentaram um aumento significativo do teor de polifenóis totais: FA e FC apresentaram, respetivamente, teores de 131 e 138 mg EAG/100 g p.s. e as amostras LA e LC apresentaram, respetivamente, teores de 133 e 154 mg EAG/100 g p.s. Ao fim de três meses de armazenamento, os teores das amostras secas no forno não apresentaram variações face ao mês anterior mas as amostras liofilizadas registaram um comportamento inverso: LA sofreu um novo aumento significativo para 152 mg EAG/100 g p.s., enquanto que LC sofreu uma redução significativa para 125 mg EAG/100 g p.s..

Enquanto nos extratos etanólicos, todas as amostras, ao fim dos três meses de estudo, apresentaram um TPC significativamente inferior face ao registado inicialmente, no caso dos extratos aquosos esta tendência já não se verificou, tendo, inclusivamente, havido registo de aumento deste parâmetro. Também Gupta, Cox e Abu-Ghannam (2011) procurou estudar o efeito da secagem em forno de ar quente no teor de polifenóis totais e no teor de flavonoides totais (TFC) em extratos metanólicos da macroalga castanha *H. elongata*, aplicando diferentes temperaturas de secagem (25, 30, 35 e 40 °C) durante 24 h —tendo verificado, para todas as temperaturas, uma redução significativa nos TPC e TFC, comparativamente com os extratos frescos. No entanto, ao fim de 2-4h de secagem (momento em que o teor de humidade teria sido reduzido em cerca de 50 %), detetaram um aumento no TPC para as duas temperaturas mais elevadas, sugerindo que o estado semi-seco da alga poderá ser nutricionalmente mais



interessante, em termos fitoquímicos, do que o estado fresco, podendo constituir um ponto de partida interessante para o processamento de macroalgas. Este estudo sugeriu ainda que, apesar do comprovado efeito degradativo da temperatura nos compostos termossensíveis, a aplicação de altas temperaturas pode, por outro lado, ter um efeito de inativação de enzimas oxidativas responsáveis pela degradação de compostos de natureza fenólica e, desta forma, contrariar esse efeito. Neste caso, os resultados obtidos sugerem a ocorrência de reações de conversão que originaram uma maior fração de compostos mais hidrofílicos em detrimento de lipofílicos.

Em termos de influência da temperatura de armazenamento, a temperatura de congelação registou valores significativamente superiores para a amostra liofilizada em t=2 meses e para a amostra seca no forno em t=3 meses, embora, neste último mês, a amostra LA tenha registado um teor significativamente superior ao de LC.

Estas diferenças entre extratos etanólicos vs. extratos aquosos refletem a influência do solvente utilizado na extração dos polifenóis – a solubilidade destes compostos depende do próprio solvente utilizado, mas também da sua polaridade, do grau de polimerização, das interações estabelecidas com outros constituintes e da formação de complexos insolúveis (Mounir e Salma, 2014). Daqui decorre que o perfil particular de compostos fenólicos em cada tipo de extracto pode ser potencialmente muito distinto. Mellouk et al. (2017) detetou um teor de polifenóis totais de, respetivamente, 39 e 22 mg EAG/100 g p.s. em extratos aquosos e etanólicos de amostras de *A. taxiformis* secas e armazenadas à temperatura ambiente e Yildiz et al. (2011) registou um teor de 35 mg EAG/100 g p.s. em extratos metanólicos de amostras liofilizadas da macroalga vermelha *Gracilaria bursapastoris*. Estes valores não apresentam grande proximidade com os resultados obtidos, no entanto o estudo de Mellouk et al. (2017) evidenciou, igualmente, um TPC mais elevado na extração aquosa que foi também observado por López et al. (2011) na macroalga castanha *Stypocaulon scoparium*. É importante referir que uma série de fatores intrínsecos pode afetar a concentração de compostos fenólicos, nomeadamente a localização geográfica, o clima e estado de maturação da alga no momento da colheita (Aganga e Mosase, 2001).

Convém referir ainda que, ao longo dos três meses de estudo, os extratos aquosos apresentaram, tanto nas amostras armazenadas à temperatura ambiente como nas amostras armazenadas à temperatura de congelação, um crescente aumento da viscosidade e turbidez que dificultou, tanto a extração dos polifenóis totais, como os próprios ensaios de quantificação do seu teor e respetiva atividade antioxidante. Este aumento de viscosidade poderá ser explicado por uma provável degradação da

estrutura das paredes celulares que, uma vez em contacto com o solvente aquoso, poderá ter levado a uma libertação de hidratos de carbono e, em particular, de substâncias hidrocoloidais. Contrariamente, os extratos etanólicos registaram menos flutuações no TPC ao longo do estudo de conservação, o que poderá ser porventura relacionado com a ausência de alterações no seu aspeto ao longo dos três meses — caracterizado por uma maior fluidez e transparência.

#### 4.4 Atividade Antioxidante

##### **Atividade Antioxidante – DPPH**

Os resultados relativos à atividade antioxidante medida através do método DPPH dos extratos etanólicos e aquosos da *A. taxiformis* encontram-se, respetivamente, apresentados nas **Tabelas 5 e 6**.

**Tabela 5:** Atividade antioxidante medida através do **método DPPH** (mg EAA/100 g p.s.) dos **extratos etanólicos** da *A. taxiformis*. Os valores encontram-se apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão. Para cada linha, valores com diferentes índices superiores (a-f) são estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ); para cada coluna, valores com diferentes índices superiores (w-z) são estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

tempo(mês)	FA	FC	LA	LC
0	51,9 $\pm$ 0,5 <sup>aw</sup>	51,9 $\pm$ 0,5 <sup>aw</sup>	34,2 $\pm$ 0,5 <sup>bw</sup>	34,2 $\pm$ 0,5 <sup>bw</sup>
1	46,5 $\pm$ 0,8 <sup>ax</sup>	44,8 $\pm$ 0,1 <sup>bx</sup>	33,2 $\pm$ 0,6 <sup>cw</sup>	24,0 $\pm$ 0,3 <sup>dx</sup>
2	44,5 $\pm$ 0,1 <sup>ay</sup>	45,5 $\pm$ 0,1 <sup>axy</sup>	41,9 $\pm$ 0,2 <sup>bx</sup>	32,0 $\pm$ 0,3 <sup>cy</sup>
3	44,9 $\pm$ 0,2 <sup>ay</sup>	45,6 $\pm$ 0,3 <sup>ay</sup>	42,0 $\pm$ 0,2 <sup>bx</sup>	35,0 $\pm$ 0,5 <sup>cw</sup>

**FA e FC** - amostras secas no forno (F) armazenadas à temperatura ambiente (A) e à temperatura de congelação (C);  
**LA e LC** - amostras liofilizadas (L) armazenadas à temperatura ambiente (A) e à temperatura de congelação (C).

Relativamente aos extratos etanólicos, para o tempo inicial, registou-se uma atividade antioxidante significativamente superior nas amostras secas no forno (52 mg EAA/100 g p.s.) comparativamente com a que foi registada nas amostras liofilizadas (34 mg EAA/100 g p.s.). Ao fim de um mês de armazenamento, a atividade sofreu uma descida significativa para todas as amostras, exceto a atividade da amostra LA, a qual permaneceu estável. Verificou-se, para este mês, que as amostras armazenadas à temperatura ambiente, FA (aproximadamente 47 mg EAA/100 g p.s.) e LA (aproximadamente 33 mg EAA/100 g p.s.), apresentaram uma atividade antioxidante significativamente superior à apresentada nas amostras armazenadas à temperatura de congelação, FC (aproximadamente 45 mg EAA/100 g p.s.) e LC (aproximadamente 24 mg EAA/100 g p.s.). Ao fim de dois meses, a amostra FA sofreu um novo decréscimo significativo para 44,5 mg EAA/100 g p.s., enquanto que a atividade de FC permaneceu estável face ao mês anterior. Pelo contrário, as amostras liofilizadas, LA e LC, sofreram um aumento significativo para, respetivamente, 42 e 32 mg EAA/100 g p.s.. Ao fim de

três meses, a atividade antioxidante das amostras FA, FC e LA não apresentou variações significativas face ao mês anterior, ao passo que a amostra LC registou um novo aumento significativo para, aproximadamente 35 mg EAA/100 g p.s.. De uma forma geral, verificou-se que, para todos os meses, as amostras secas no forno apresentaram uma atividade significativamente superior à das amostras liofilizadas, o que contrasta totalmente com o cenário observado para o teor de polifenóis totais. Além disto, em função da temperatura de armazenamento, as diferenças significativas registadas apontaram sempre para uma atividade antioxidante significativamente superior nas amostras armazenadas à temperatura ambiente.

No que diz respeito ao efeito do processo de secagem, o estudo de Le Lann, Jégou e Stiger-Pouvreau (2008), que tinha já sido concordante com os resultados obtidos para o TPC dos extratos etanólicos, mostrou também concordância relativamente à atividade antioxidante medida através do método DPPH – verificaram, igualmente, uma atividade significativamente superior nas amostras sujeitas à secagem no forno comparativamente com a atividade registada nas amostras liofilizadas, nas amostras congeladas durante três semanas e, inclusivamente, nas amostras frescas. No entanto, o estudo de Ling et al. (2014), que tinha sido já contrastante com os resultados obtidos para o TPC, mostrou também uma divergência na atividade antioxidante medida através do método DPPH – os extratos etanólicos de *K. alvarezii* registaram uma atividade significativamente superior nas amostras liofilizadas comparativamente com as secas no forno.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, para os extratos etanólicos da *A. taxiformis*, as condições aplicadas no processo de secagem no forno, apesar de terem tido um efeito de degradação no teor de polifenóis totais face às condições aplicadas na liofilização, parecem ter promovido a síntese e/ou transformação de outros compostos com maior capacidade antioxidante e, simultaneamente, a temperatura ambiente terá promovido a ação destes.

No tocante aos extratos aquosos, verificou-se, para  $t=0$ , que o processo de secagem não produziu diferenças significativas no nível de atividade antioxidante, ao contrário do observado para os extratos etanólicos. Ao fim de um mês, a atividade antioxidante sofreu um aumento significativo para todas as amostras, exceto para LC — as amostras secas no forno sofreram um aumento de 14 para, respetivamente, 24 e 21 mg EAA/100 g p.s, em FA e FC; a amostra liofilizada passou de 17 para 22 mg EAA/100 g p.s em LA. Em termos de efeito de temperatura de armazenamento, as amostras

armazenadas à temperatura ambiente registraram valores de atividade significativamente superiores, face às congeladas.

**Tabela 6:** Atividade antioxidante medida através do **método DPPH** (mg EAA/100 g p.s.) dos **extratos aquosos** da *A. taxiformis*. Os valores encontram-se apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão. Para cada linha, valores com diferentes índices superiores (a-f) são estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ); para cada coluna, valores com diferentes índices superiores (w-z) são estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

tempo(mês)	FA	FC	LA	LC
0	14,0 $\pm$ 3,0 <sup>aw</sup>	14,0 $\pm$ 3,0 <sup>aw</sup>	17,1 $\pm$ 0,6 <sup>aw</sup>	17,1 $\pm$ 0,6 <sup>aw</sup>
1	23,8 $\pm$ 0,4 <sup>ax</sup>	21,1 $\pm$ 0,7 <sup>bx</sup>	22,2 $\pm$ 1,3 <sup>abx</sup>	17,2 $\pm$ 1,2 <sup>cw</sup>
2	31,5 $\pm$ 0,1 <sup>ax</sup>	38,0 $\pm$ 1,1 <sup>by</sup>	41,1 $\pm$ 2,6 <sup>by</sup>	43,0 $\pm$ 2,1 <sup>bx</sup>
3	29,0 $\pm$ 4,0 <sup>bx</sup>	46,0 $\pm$ 4,7 <sup>cy</sup>	21,9 $\pm$ 2,5 <sup>abwx</sup>	10,4 $\pm$ 0,6 <sup>ay</sup>

**FA e FC** - amostras secas no forno (F) armazenadas à temperatura ambiente (A) e à temperatura de congelação (C);  
**LA e LC** - amostras liofilizadas (L) armazenadas à temperatura ambiente (A) e à temperatura de congelação (C).

Ao fim de dois meses, voltou a registar-se uma nova subida do nível de atividade para todas as amostras: FA e FC registaram atividades de 32 e 38 mg EAA/100 g p.s e LA e LC registaram valores de 41 e 43 mg EAA/100 g p.s. Aqui neste ponto, observou-se um nível de atividade significativamente inferior em FA, comparativamente com as restantes amostras.

No momento final, todas as amostras liofilizadas sofreram um decréscimo significativo da atividade antioxidante. Neste ponto final, foi a amostra FC que registou uma atividade significativamente superior, comparativamente com as restantes amostras. Embora se tenha observado algumas flutuações da atividade ao longo do tempo e não se tenha verificado esta tendência em todos os meses, registou-se, ainda assim, valores de atividade significativamente superiores nas amostras secas no forno em t=3.

O nível de atividade antioxidante significativamente superior nas amostras secas no forno, claramente evidente nos extratos etanólicos, sugere que a temperatura tenha tido um efeito potenciador neste parâmetro e existem estudos na literatura que suportam o fenómeno aqui observado. Um estudo realizado por Tonon et al. (2010) com amostras de açaí submetidas a um processo de *spray-drying* procurou estudar o efeito do tempo e da temperatura de armazenamento (temperatura ambiente vs. temperatura de 35 °C) na estabilidade do teor em antocianinas e na sua atividade antioxidante (método DPPH), tendo sido observada uma maior degradação nas amostras armazenadas à temperatura de 35 °C mas, em termos de atividade antioxidante, estas apresentaram uma maior

atividade do que nas amostras armazenadas à temperatura ambiente. Também o estudo de Rajauria et al. (2010) revelou que a atividade antioxidante (método DPPH) das macroalgas castanhas *Laminaria saccharina*, *Laminaria digitata* e *H. elongata* foi significativamente superior em amostras sujeitas a processos térmicos em comparação com amostras frescas. Uma possível explicação para este fenómeno remete para o facto de a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos não estar apenas relacionada com a sua tendência de doar iões de hidrogénio ou eletrões mas também com a estabilidade dos seus derivados intermédios que, potenciados pela temperatura, apresentam maior poder antioxidante. Maillard et al. (1996) sugeriu que a ação da temperatura pode desencadear a degradação parcial de alguns polímeros constituintes das paredes celulares aos quais se encontram, frequentemente, ligados alguns compostos fenólicos, tais como o ácido ferúlico ou o ácido cumárico. Esta degradação pode conduzir à libertação de derivados de compostos fenólicos, quer por alterações nos padrões de substituição dos núcleos aromáticos dos compostos fenólicos, quer por alterações no nível de oxidação das cadeias laterais, que poderão apresentar um maior poder antioxidante.

#### **Atividade Antioxidante – ABTS**

Os resultados relativos à atividade antioxidante medida através do método ABTS dos extratos etanólicos e aquosos da *A. taxiformis* encontram-se, respetivamente, apresentados nas **Tabelas 7 e 8**.

**Tabela 7:** Atividade antioxidante medida através do **método ABTS** (mmol Etrolox/100 g p.s.) dos **extratos etanólicos** da *A. taxiformis*. Os valores encontram-se apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão. Para cada linha, valores com diferentes índices superiores (a-f) são estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ); para cada coluna, valores com diferentes índices superiores (w-z) são estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

tempo(mês)	FA	FC	LA	LC
0	0,26 $\pm$ 0,04 <sup>aw</sup>	0,26 $\pm$ 0,04 <sup>aw</sup>	1,75 $\pm$ 0,22 <sup>bw</sup>	1,75 $\pm$ 0,22 <sup>bw</sup>
1	0,93 $\pm$ 0,08 <sup>ax</sup>	1,18 $\pm$ 0,06 <sup>ax</sup>	2,33 $\pm$ 0,18 <sup>bx</sup>	2,46 $\pm$ 0,09 <sup>bx</sup>
2	0,62 $\pm$ 0,06 <sup>ay</sup>	0,80 $\pm$ 0,05 <sup>by</sup>	1,65 $\pm$ 0,35 <sup>cw</sup>	2,44 $\pm$ 0,02 <sup>dx</sup>
3	0,75 $\pm$ 0,06 <sup>ay</sup>	0,90 $\pm$ 0,08 <sup>ay</sup>	1,67 $\pm$ 0,03 <sup>bw</sup>	2,42 $\pm$ 0,05 <sup>cx</sup>

**FA e FC** - amostras secas no forno (F) armazenadas à temperatura ambiente (A) e à temperatura de congelação (C);  
**LA e LC** - amostras liofilizadas (L) armazenadas à temperatura ambiente (A) e à temperatura de congelação (C).

Para o tempo inicial, as amostras liofilizadas (1,75 mmol Etrolox/100 g p.s.) apresentaram um valor de atividade antioxidante significativamente superior ao registado para as amostras secas no forno (0,26 mmol Etrolox/100 g p.s.). Esta diferença significativa entre o processo de secagem no forno vs. liofilização foi igualmente observada ao longo dos três meses de estudo. Estes resultados, por um

lado, concordam com o que foi observado para o teor de polifenóis totais e, por outro, contrastam por completo, com os resultados obtidos para a atividade antioxidante medida através do método DPPH. Tal facto não é inesperado, na medida em que os métodos ABTS e DPPH medem diferentes aspetos da capacidade antioxidante e possuem diferentes sensibilidades para diferentes classes de compostos bioativos. Efetivamente, o ABTS deteta atividade antioxidante por transferência eletrónica simples (redução direta do ABTS•+) ou destruição de radicais por transferência de um átomo de hidrogénio (Prior et al., 2005). O catião radical ABTS é solúvel em solventes aquosos e orgânicos, tornando o método adequado para a determinação da atividade antioxidante de compostos lipofílicos e hidrofílicos em várias matrizes (Martysiak-Żurowska, 2012). Por outro lado, o método DPPH é baseado principalmente na reação de transferência de electrões (Martysiak-Żurowska, 2012).

Numa comparação dos resultados obtidos com a literatura científica, há a referir que o estudo de Ling et al. (2014) para a macroalga *K. alvarezii* revelou uma atividade antioxidante medida através do método ABTS significativamente superior para as amostras secas no forno. De facto, este estudo apresenta um cenário totalmente divergente do que foi observado para a *A. taxiformis*: para extratos metanólicos da macroalga vermelha *K. alvarezii*, o teor de polifenóis totais e a atividade antioxidante (ABTS) foram significativamente superiores nas amostras secas no forno, enquanto que a atividade antioxidante (DPPH) foi significativamente superior nas amostras liofilizadas; no presente estudo (para o tempo t=0) os extratos etanólicos da macroalga vermelha *A. taxiformis* apresentaram um teor de polifenóis totais e uma atividade antioxidante (ABTS) significativamente superior nas amostras liofilizadas, ao passo que a atividade antioxidante (DPPH) foi significativamente superior nas amostras secas no forno. Apesar da divergência, há uma concordância no facto do efeito do processo de secagem produzir o mesmo efeito no TPC e na atividade antioxidante medida através do método ABTS e produzir um efeito oposto na atividade antioxidante medida através do método DPPH.

No entanto, a variação temporal dos resultados do ABTS foi distinta da dos teores de polifenóis totais, pois estes decresceram ao fim de um mês de armazenamento. A isto acresce que a constância dos níveis de polifenóis totais ao longo dos restantes meses de estudo não se verificou no caso do ABTS —ao fim do primeiro mês, verificou-se, para todas as amostras, um aumento significativo da atividade antioxidante: as amostras secas no forno, FA e FC, apresentaram, respetivamente, um valor de atividade de 0,93 e 1,18 mmol Etrolox/100 g p.s. e as amostras liofilizadas apresentaram, respetivamente, um valor de atividade de 2,33 e 2,46 mmol Etrolox/100

g p.s. Ao fim de dois meses, todas as amostras, exceto LC, apresentaram uma redução significativa da atividade. Ao fim de três meses, os valores de atividade não sofreram variações significativas relativamente ao mês anterior. No que diz respeito ao efeito da temperatura de armazenamento, nos dois últimos dois meses e, apenas para as amostras liofilizadas, é que se detetaram diferenças significativas —as amostras LC apresentaram níveis de atividade significativamente superiores aos registados para as amostras LA.

Observando agora os resultados obtidos para os extratos aquosos, verificou-se, para o tempo inicial, uma atividade de 1,17 e de 0,84 mmol Etrolox/100 g p.s. para as amostras L e F, respetivamente. Logo ao fim do primeiro mês, registou-se um aumento significativo de atividade para todas as amostras, tendo FC registado um valor significativamente inferior (1,81 mmol Etrolox/100 g p.s.) comparativamente com FA, LA e LC (2,37; 2,11 e 2,42 mmol Etrolox/100 g p.s., respetivamente).

**Tabela 8:** Atividade antioxidante medida através do método ABTS (mmol Etrolox/100 g p.s.) dos extratos aquosos da *A. taxiformis*. Os valores encontram-se apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão. Para cada linha, valores com diferentes índices superiores (a-f) são estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ); para cada coluna, valores com diferentes índices superiores (w-z) são estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

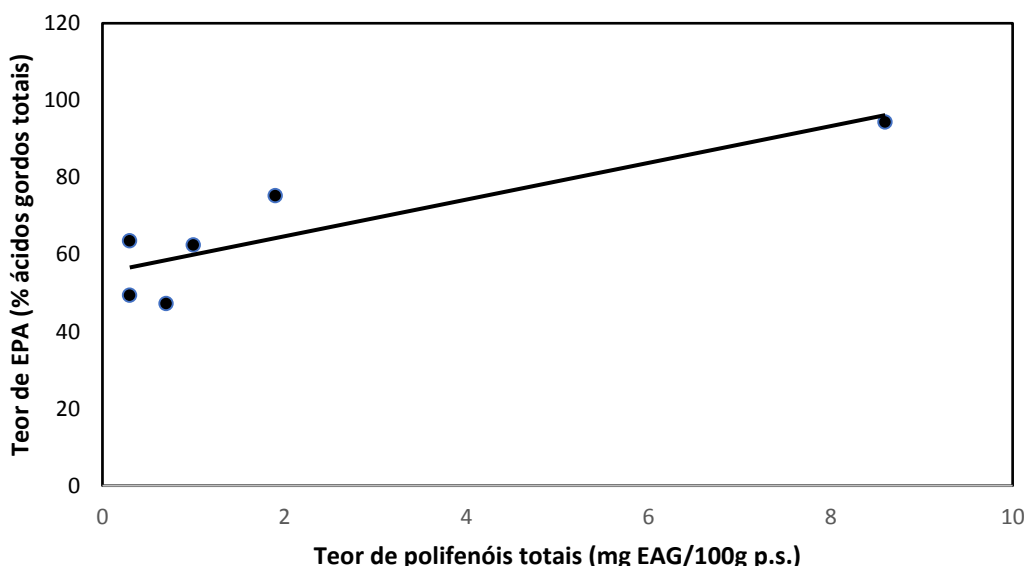
tempo(mês)	FA	FC	LA	LC
0	0,84 $\pm$ 0,14 <sup>aw</sup>	0,84 $\pm$ 0,14 <sup>aw</sup>	1,17 $\pm$ 0,13 <sup>aw</sup>	1,17 $\pm$ 0,13 <sup>aw</sup>
1	2,37 $\pm$ 0,24 <sup>ax</sup>	1,81 $\pm$ 0,25 <sup>bx</sup>	2,11 $\pm$ 0,06 <sup>abx</sup>	2,42 $\pm$ 0,22 <sup>ax</sup>
2	2,17 $\pm$ 0,15 <sup>ax</sup>	3,52 $\pm$ 0,25 <sup>by</sup>	2,67 $\pm$ 0,40 <sup>ax</sup>	3,51 $\pm$ 0,35 <sup>by</sup>
3	2,13 $\pm$ 0,05 <sup>ax</sup>	4,40 $\pm$ 0,23 <sup>cxz</sup>	2,50 $\pm$ 0,10 <sup>abx</sup>	2,89 $\pm$ 0,51 <sup>bxy</sup>

**FA e FC** - amostras secas no forno (F) armazenadas à temperatura ambiente (A) e à temperatura de congelação (C);  
**LA e LC** - amostras liofilizadas (L) armazenadas à temperatura ambiente (A) e à temperatura de congelação (C).

Ao fim de dois meses, verificou-se que apenas as amostras armazenadas à temperatura de congelação, FC e LC, voltaram a sofrer, face ao mês anterior, um aumento significativo passando a apresentar uma atividade de, aproximadamente, 3,5 mmol Etrolox/100 g p.s., a qual, por sua vez, foi significativamente superior à atividade registada para as amostras armazenadas à temperatura ambiente, FA e LA. Ao fim dos três meses, esta diferença significativa entre a temperatura de congelação e temperatura ambiente continuou a verificar-se, tendo sido registado um teor máximo de atividade para a amostra FC que atingiu os 4,40 mmol Etrolox/100 g p.s., significativamente superior ao registado no mês anterior e ao das restantes amostras. Para os extratos aquosos, ao contrário do verificado para os extratos etanólicos, as amostras liofilizadas não apresentaram globalmente uma atividade significativamente superior à das amostras secas no forno, tendo inclusivamente, a amostra FC ( $t=3$

meses) apresentado o valor máximo de atividade. De uma forma geral, no caso dos extratos aquosos, os resultados de atividade antioxidante observados com a aplicação do método ABTS refletiram os resultados do teor total de compostos fenólicos determinados: comparando o tempo inicial com o tempo final, verificou-se, para todas as amostras, um aumento significativo do teor total de fenólicos e da atividade antioxidante.

Testaram-se várias correlações entre o teor de polifenóis totais dos dois tipos de extratos e as respectivas atividades antioxidantes (DPPH e ABTS), mas não se obteve um forte fator de correlação para nenhum dos casos. No entanto, tal como já referido anteriormente na **secção 4.2**, a presença de compostos antioxidantes pode ter influência no nível de oxidação dos ácidos gordos e, desta forma, testou-se uma eventual correlação entre o teor de EPA e o teor de polifenóis totais (**Figura 9**), tendo sido verificado um  $R^2 = 0,7677$  entre a concentração deste ácido gordo e o teor de polifenóis dos extratos etanólicos – este fator de correlação sugere que os extratos etanólicos, nos quais estarão os compostos mais lipofílicos, poderão ter apresentado alguma capacidade de ação sobre os ácidos gordos no sentido de prevenir a sua degradação, nomeadamente no caso do EPA, um ácido gordo particularmente sensível à presença de espécies reativas de oxigénio dada a sua natureza polinsaturada.



**Figura 9:** Correlação entre o teor de polifenóis totais dos extratos etanólicos (mg EAG/100 g p.s.) e o teor de EPA (% ácidos gordos totais) das amostras F<sub>0</sub>, L<sub>0</sub>, FA<sub>3</sub>, FC<sub>3</sub>, LA<sub>3</sub> e LC<sub>3</sub> da *A. taxiformis*

#### 4.5 Atividade Anti- inflamatória



Convém referir, desde já, que os extratos aquosos e etanólicos das amostras iniciais ( $F_0$  e  $L_0$ ) foram testados para uma avaliação preliminar do potencial anti-inflamatório, tendo sido testada uma concentração de 10 mg/ml. Dado que este teste revelou uma resposta positiva no caso dos extratos etanólicos, decidiu-se proceder a uma investigação completa da atividade anti-inflamatória de todas as amostras (iniciais, intermédias e finais), usando a extração etanólica e descendo até uma concentração mais desafiante e concordante com a literatura de 1 mg/ml. Desta forma, os resultados obtidos da análise anti-inflamatória dos extratos etanólicos das diferentes amostras encontram-se apresentados na **Tabela 9**.

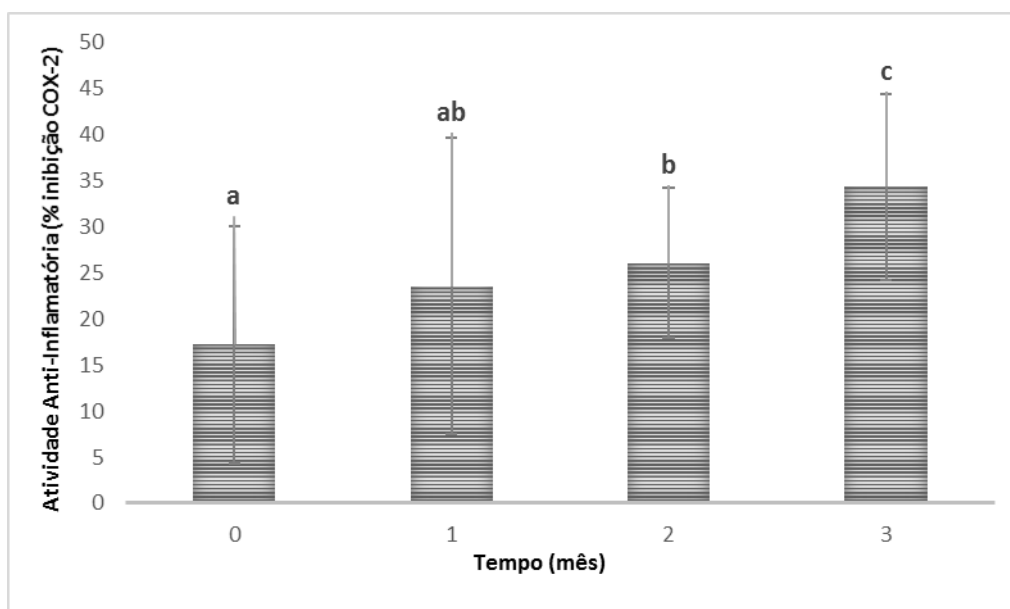
**Tabela 9: Atividade anti-inflamatória** (% inibição da COX-2) dos **extratos etanólicos** da *A. taxiformis*. Os valores encontram-se apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão. Para cada linha, valores com diferentes índices superiores (a-d) são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ); Para cada coluna, valores com diferentes índices superiores (w-z) são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

tempo (mês)	FA	FC	LA	LC
0	29 $\pm$ 7 <sup>aw</sup>	29 $\pm$ 8,0 <sup>aw</sup>	5,7 $\pm$ 2,9 <sup>bw</sup>	5,7 $\pm$ 2,9 <sup>bw</sup>
1	20 $\pm$ 5 <sup>aw</sup>	3,0 $\pm$ 3,0 <sup>aw</sup>	20 $\pm$ 8 <sup>awx</sup>	44 $\pm$ 4 <sup>by</sup>
2	15 $\pm$ 3 <sup>aw</sup>	26 $\pm$ 6,0 <sup>abw</sup>	30 $\pm$ 5 <sup>bxy</sup>	32 $\pm$ 7 <sup>bxy</sup>
3	40 $\pm$ 11 <sup>ax</sup>	30 $\pm$ 12 <sup>aw</sup>	40 $\pm$ 7 <sup>ay</sup>	26 $\pm$ 4 <sup>ax</sup>

**FA e FC** - amostras secas no forno (F) armazenadas à temperatura ambiente (A) e à temperatura de congelação (C); **LA e LC** - amostras liofilizadas (L) armazenadas à temperatura ambiente (A) e à temperatura de congelação (C).

Os resultados obtidos, em função das três variáveis em estudo, caracterizaram-se por uma grande flutuação. Inicialmente, as amostras secas no forno (29 % de inibição) apresentaram uma atividade significativamente superior à das amostras liofilizadas (6 % de inibição), sugerindo, desde logo, que as condições aplicadas no processo de secagem no forno tenham promovido a síntese de compostos com ação anti-inflamatória. No entanto, para  $t=1$  mês, enquanto que as amostras secas no forno não sofreram variações significativas, já as amostras liofilizadas registaram um aumento significativo para 20 e 44 % de inibição para LA e LC, respetivamente. Neste momento temporal a amostra LC apresentou um valor de atividade significativamente superior ao de LA. Ao fim de dois meses, a atividade de todas as amostras permaneceu estável face à atividade registada no mês anterior e no último momento temporal deste estudo, a atividade das amostras secas no forno sofreu a única variação significativa, tendo sido registada uma subida para 40 % de inibição em FA, ao passo que as amostras liofilizadas não registaram variações.

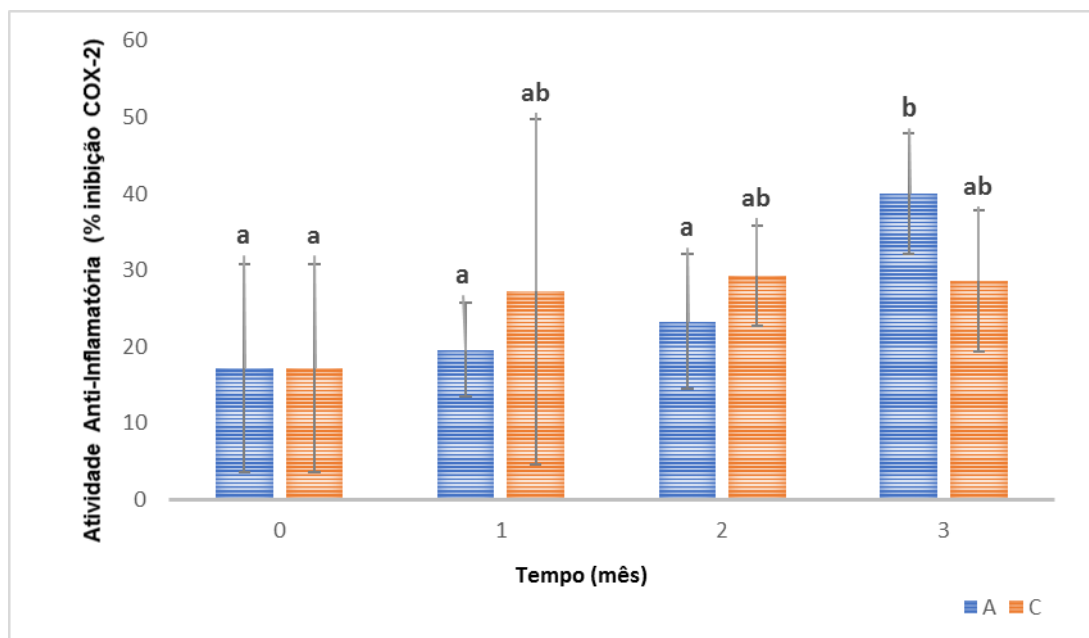
Dado que este método de análise tem uma grande variabilidade associada, procurou-se avaliar, com base numa perspectiva mais abrangente, o efeito das variáveis em estudo na atividade anti-inflamatória dos extratos de forma a detetar a existência de qualquer tendência na evolução deste parâmetro. Desta forma, analisando o gráfico da **Figura 10**, que contempla a atividade de todas as amostras analisadas para cada momento temporal, observou-se que, de facto, a atividade anti-inflamatória sofreu um aumento significativo ao fim dos três meses de estudo – inicialmente, as amostras iniciais registaram um nível de atividade médio de 17 % de inibição, em contraste com o momento final, quando a atividade média de todas as amostras chegou a atingir os 34 % de inibição. Daqui se concluiu que o fator tempo potenciou a ação anti-inflamatória dos compostos envolvidos nas reações de inibição da enzima COX-2.



**Figura 10:** Efeito do fator tempo na atividade anti-inflamatória (% inibição da COX-2) dos **extratos etanólicos** da *A. taxiformis*. Diferentes letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre os diferentes momentos temporais ( $p < 0,05$ ); as barras verticais correspondem ao desvio padrão.

Analisando agora o gráfico da **Figura 11**, que compara a atividade anti-inflamatória das amostras armazenadas à temperatura ambiente vs. temperatura de congelação, verificou-se que a primeira desencadeou alterações nos extratos que não foram detetadas na segunda – as amostras iniciais,  $F_0$  e  $L_0$ , apresentaram uma atividade média de 17 % de inibição e, ao fim dos três meses de estudo,  $FA_3$  e  $LA_3$  registaram uma atividade média significativamente superior (40 % de inibição). Já as amostras  $FC_3$  e  $LC_3$  registaram uma atividade média de 29 % que não variou significativamente face ao valor inicial. Estes resultados mostraram que a temperatura ambiente gerou

determinadas alterações que promoveram a ação dos compostos envolvidos na inibição da enzima COX-2, alterações estas que ficaram por detetar no caso das amostras congeladas.



**Figura 11:** Efeito do fator temperatura de armazenamento (A – ambiente vs. C- congelação) na atividade anti-inflamatória (% inibição da COX-2) dos **extratos etanólicos** da *A. taxiformis*. Diferentes letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre os diferentes momentos temporais ( $p < 0,05$ ); as barras verticais correspondem ao desvio padrão.

Na literatura encontram-se diversos estudos que têm vindo a comprovar a atividade anti-inflamatória de diferentes tipos de extratos de várias espécies de macroalgas e a atribuir esta bioatividade a inúmeras classes de compostos químicos tais como compostos fenólicos, carotenóides, alcalóides, proteínas e polissacáridos (Hoong et al., 2018; Zhou et al., 2015; Pangestuti et al., 2013; De Souza et al., 2009; Admassu et al., 2017).

No entanto, devido à ampla variabilidade de métodos com base nos quais o potencial anti-inflamatório pode ser avaliado, tornou-se difícil estabelecer comparações de resultados entre si. Ainda assim, existem vários estudos com extratos de diversas macroalgas que comprovaram a atividade anti-inflamatória recorrendo à análise da sua ação inibitória na enzima COX-2: Kim et al. (2013) observou, num estudo *in vitro*, que o floridosídeo, um galactosídeo naturalmente presente na macroalga vermelha *Laurencia undulata*, apresentou, numa gama de concentrações 1-50  $\mu\text{M}$ , potencial de neutralizar os danos cerebrais neurológicos induzidos por neuroinflamação, por inibição da expressão do gene codificante para a enzima COX-2. Jin et al. (2006) demonstrou igualmente que extratos metanólicos (50  $\mu\text{g/ml}$ ) da macroalga verde *Ulva conglobata*

suprimiram completamente a expressão da COX-2. No entanto, note-se que esta ação inibidora incide na expressão genética e não na atividade enzimática da COX-2, tal como foi testada no estudo subjacente a esta tese. Usando uma metodologia idêntica, há a destacar o trabalho experimental de Ripol et al. (2018), onde foi demonstrado o potencial anti-inflamatório (31-45%) de extratos aquosos (1 mg/ml) das macroalgas verdes *Chaetomorpha linum*, *Rhizoclonium riparium*, *U. intestinalis*, *Ulva lactuca* e *Ulva prolifera*. Também Campos et al. (2018) verificou para, respetivamente, extratos etanólicos e aquosos (1 mg/ml) das macroalgas castanhas *Halopteris scoparia* e *Petalonia binghamiae* percentagens de inibição da COX-2 de 40 e 79 %.

No caso da *A. taxiformis*, o estudo preliminar sugeriu que o potencial anti-inflamatório desta macroalga estará mais associado a compostos solúveis em etanol em detrimento dos solúveis em água. No entanto não se verificou uma correlação entre o TPC dos extratos etanólicos e a atividade anti-inflamatória registada. Ainda assim, o  $\beta$ -caroteno, um carotenóide particularmente relevante em macroalgas vermelhas, foi já identificado como um agente anti-inflamatório por inibição da síntese de COX-2 ao nível da transcrição do RNA mensageiro (Bai et al., 2005; Haugan e Liaaen-Jensen, 1994; Pereira, 2015a). Resta investigar se esta ação anti-inflamatória do  $\beta$ -caroteno se estende à inibição da própria atividade da COX-2. Ainda a este propósito, convém ainda esclarecer que, apesar de ter sido referido na secção introdutória que o grupo dos PUFA  $\omega$ 3, em particular o EPA, tem uma ação direta nas reações envolvidas nos processos anti-inflamatórios, a sua ação não passa pela inibição da atividade da enzima COX-2.

Ficou aqui demonstrado o potencial anti-inflamatório de extratos etanólicos (1 mg/ml) da *A. taxiformis*, igualmente verificado para outras espécies do grupo das Rhodophyta, reforçando o eventual interesse na exploração desta bioatividade para diversas aplicações biotecnológicas. O *Aquamín*, por exemplo, é um suplemento alimentar com atividade anti-neuroinflamatória aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) que consiste num derivado multi-mineral extraído da macroalga vermelha *Lithothamnion corallioides* (Ryan, O’Gorman e Nolan, 2011). Adicionalmente, na macroalga vermelha *P. capillacea* foi identificada uma lectina com potencial anti-inflamatório (Silva et al., 2010).

## 5. Conclusão e Perspetivas Futuras

Em termos de eficácia dos processos de secagem da *A. taxiformis*, a secagem no forno (60 °C, 72 h) foi mais eficaz do que a liofilização (-40 °C, 48 h,  $4 \times 10^{-4}$  mbar), facto evidenciado pelo teor de humidade significativamente superior nas amostras liofilizadas (5,6 g/100 g p.s.), comparativamente com as amostras secas no forno (2,7 g/100 g p.s.).

No que diz respeito ao impacto destes dois processos na composição bioquímica da macroalga, há a destacar as variações significativas registadas na composição de ácidos gordos, nomeadamente no teor de EPA (20:5  $\omega$ 3): as amostras secas no forno registaram um teor significativamente inferior (1,9 %), comparativamente com o registado nas amostras liofilizadas (8,6 %); também o rácio  $\omega$ 3: $\omega$ 6 apresentou um valor respetivo de, aproximadamente, 2:1 e 4:1, reforçando o maior efeito degradativo do processo de secagem no forno no teor dos PUFA  $\omega$ 3. Além disto, os extratos aquosos e etanólicos das amostras liofilizadas apresentaram também um TPC significativamente superior. Já a atividade antioxidante apresentou variações significativas apenas nos extratos etanólicos: para as amostras liofilizadas, esta bioatividade registou níveis significativamente superiores no caso do método de ABTS, mas significativamente inferiores no caso do método de DPPH. Em relação à atividade anti-inflamatória, os extratos etanólicos (1 mg/ml) mostraram níveis de inibição da COX-2 significativamente superiores nas amostras secas no forno.

Em termos de impacto da temperatura de armazenamento, o principal resultado a destacar foi o nível de atividade anti-inflamatória que, considerando todas as amostras, registou um valor significativamente superior nas armazenadas à temperatura ambiente, sugerindo que estas condições geraram alterações que promoveram a ação dos compostos envolvidos na inibição da enzima COX-2, alterações estas que ficaram por detetar no caso das amostras congeladas.

No que diz respeito ao fator tempo, verificou-se, para as amostras liofilizadas, uma perda acentuada de EPA ao fim dos três meses de estudo; o teor de polifenóis totais nos extratos etanólicos também registou uma redução significativa logo ao fim do primeiro mês que não coincidiu com a evolução observada no caso dos extratos aquosos, nos quais se registou um aumento do TPC ao fim do segundo mês —estes resultados sugerem a ocorrência de reações de conversão que originaram uma maior fração de compostos mais hidrofílicos em detrimento de lipofílicos. Na atividade anti-

inflamatória, considerando todas as amostras, registou-se um aumento progressivo da ação inibitória na enzima COX -2 ao longo dos três meses de estudo.

Desta forma, salvaguardando algumas exceções relativas às bioatividades, a liofilização da *A. taxiformis* revelou ser o processo mais preservador comparativamente com a secagem no forno. No entanto, independentemente do processo de secagem aplicado, o armazenamento da biomassa seca ao longo dos três meses de estudo implicou alterações significativas na sua composição, alterações estas que não foram evitadas em nenhuma das temperaturas de armazenamento.

Há a referir ainda que não foram detetadas fortes correlações entre o teor de polifenóis totais e as atividades antioxidante e anti-inflamatória, sugerindo que estas bioatividades estarão dependentes de outros compostos não estudados, nomeadamente dos carotenóides. Ainda assim, destacou-se uma correlação positiva digna de menção ( $R^2 = 0,76$ ) entre o teor de EPA e o teor de polifenóis totais dos extratos etanólicos, sugerindo que os compostos mais lipofílicos presentes nestes extratos poderão ter apresentado alguma ação protetora contra a oxidação dos ácidos gordos, em particular, no caso do EPA que, dada a sua natureza polinsaturada, apresenta uma elevada sensibilidade à presença de espécies reativas de oxigénio.

Relativamente a perspetivas futuras, e à semelhança de outros estudos já realizados para outras espécies de macroalgas, seria importante prolongar a duração do estudo de forma a avaliar a evolução dos diferentes parâmetros durante um período mais alargado. Além disto, dado que a secagem ao sol é um dos processos aplicados industrialmente, seria também relevante perceber o seu efeito na composição da macroalga. Seria ainda útil complementar os resultados obtidos neste estudo com uma avaliação da evolução do perfil fenólico dos extratos aquosos e etanólicos, uma vez que esta informação poderia ajudar a perceber as oscilações observadas no teor de polifenóis totais e nas bioatividades em função das diferentes variáveis em estudo. Por fim, dada a, já comprovada, ação anti-metanogénica do bromofórmio presente na *A. taxiformis* no rúmen das vacas, seria também relevante estudar o efeito destes fatores no seu teor e respetiva bioacessibilidade, uma vez que a otimização da incorporação desta macroalga nas rações constitui uma promissora estratégia de mitigação do problema que a emissão de metano representa no conjunto das emissões de gases do efeito de estufa.

## 6. Referências Bibliográficas

Admassu, H., Gasmalla, M., Yang, R. e Zhao, W. (2017). Bioactive Peptides Derived from Seaweed Protein and Their Health Benefits: Antihypertensive, Antioxidant, and Antidiabetic Properties. *Journal of Food Science*. 83(1): 6-16.

Aganga, A.A. e Mosase, K.W. (2001). Tannin content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capassa*, *Zizyphus mucronata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Animal Feed Science Technology*. 91:107-113.

AOAC, 2000. Official methods of analysis of the AOAC International, 17<sup>a</sup> Edição. Association of Analytical Communities. Gaithersburg.

Bai, S., Lee, S., Na, H., Ha, K., Han, J., Lee, H., Kwon, Y., Chung, C. e Kim, Y. (2005).  $\beta$ -Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF- $\kappa$ B activation. *Experimental & Molecular Medicine*. 37(4): 323-334.

Bandarra, N.M., Batista, I., Nunes, M.L., Empis, J.M.A. e Christie, W.W. (1997). Seasonal changes in lipid composition of sardine *Sardina pilchardus*. *Journal of Food Science*. 62(1): 40-43.

Becker, M., Nunes, G., Ribeiro, D., Silva, F., Catanante, G. e Marty, J. (2019). Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays. *Sociedade Brasileira de Química*. 30(5): 1108-1114.

Campos, A., Matos, J., Afonso, C., Gomes, R., Bandarra, N. e Cardoso, C. (2018). Azorean macroalgae (*Petalonia binghamiae*, *Halopteris scoparia* and *Osmundea pinnatifida*) bioprospection: a study of fatty acid profiles and bioactivity. *International Journal of Food Science & Technology*. 54(3): 880-890.

Chan, J. C.-C., Cheung, P. C.-K. e Ang, P. O. (1997). Comparative Studies on the Effect of Three Drying Methods on the Nutritional Composition of Seaweed *Sargassum hemiphyllum* (Turn.) C. Ag. †. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(8): 3056–3059.

Chew, Y.L., Lim, Y.Y., Omar, M. e Khoo, K.S. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in Southeast Asia. *LWT- Food Science Technology*. 41:1067–1072.

Choe, E. e Min, D. B. (2009). Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Food Science and Food Safety*. 8(4): 345-358.

Choe, E. e Min, D. B. (2006a). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Food Science and Food Safety*. 5(4): 169-180.

Choi, J., Lee, B., An, S., Sohn, J., Cho, K. e Choi, I. (2012). Simple freezing and thawing protocol for long-term storage of harvested fresh *Undaria pinnatifida*. *Fisheries Science*. 78(5): 1117-1123.

Chronakis, I.S., Galatanu, A.N., Nylander, T. e Lindman, B. (2000). The behaviour of protein preparations from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air/water interface. *Colloid Surface Physicochemical Engineering Aspects*. 173: 181–192.

De Souza, É., Pereira de Lira, D., Cavalcanti de Queiroz, A., Costa da Silva, D., Bezerra de Aquino, A., Campessato Mella, E., Prates Lorenzo, V., De Miranda, G., De Araújo-Júnior, J., De Oliveira Chaves, M., Barbosa-Filho, J., Filgueiras de Athayde-Filho, P., De Oliveira Santos, B. e Alexandre-Moreira, M. (2009). The Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Caulerpin, a Bisindole Alkaloid Isolated from Seaweeds of the Genus *Caulerpa*. *Marine Drugs*. 7(4): 689-704.

El-Baroty, GS., Moussa, M.Y., Shallan, M.A., Ali, M.A., Sabh, A.Z. e Shalaby, E.A. (2007). Contribution to the aroma, biological activities, minerals, protein, pigments and lipid contents of the red alga: *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan. *Journal of Applied Sciences Research*. 3: 1825–1834.

Enríquez, S., Duarte, C.M. e Sand-Jensen, K. (1993). Patterns in decomposition rates among photosynthetic organisms: the importance of detritus C:N:P content. *Oecologia*. 94(4): 457–471.

Farber, J. M. (1991). Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology- A review. *Journal of Food Protection*. 54(1): 58- 70.

Fleurence, J. Seaweed proteins. Em: Yada, R.Y. (2004). *Proteins in food processing*. Cambridge: Woodhead Publishing. 978-1-85573-723-5

Folch, J., Lees, M. e Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method of the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226(1): 497-509.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2016). *The state of world fisheries and aquaculture: Food and Agriculture Organization of the United Nations*. FAO, Fisheries and Aquaculture Department. Roma. 1-132.

Fuller, R.W., Cardellina, J.H., Kato, Y., Brinen, L.S., Clardy, J., Snader, K.M. e Boyd, M.R. (1992). A pentahalogenated monoterpene from the red alga *Portieria hornemannii* produces a novel cytotoxicity profile against a diverse panel of human tumor cell lines. *Journal of Medicinal Chemistry*. 35: 3007–3011.

Genovese, G., Tedone, L., Hamann, M.T. e Morabito, M. (2009). The mediterranean red alga *Asparagopsis*: A source of compounds against leishmania. *Marine Drugs*. 7: 361–366.

Guiry, M. e Guiry, G. (2014). *AlgaeBase - Worldwide electronic publication*. National University of Ireland, Galway. Acedido em 2 de Junho, 2019. Disponível no website <http://www.algaebase.org>

Gupta, S., Cox, S. e Abu-Ghannam, N. (2011). Effect of different drying temperatures on the moisture and phytochemical constituents of edible Irish brown seaweed. *LWT - Food Science and Technology*. 44(5): 1266–1272.

Haugan, J.A. e Liaaen-Jensen, S. (1994). Algal carotenoids. Carotenoids of brown-algae (Phaeophyceae). *Biochemical Systematics Ecology*. 22: 31–41.



Heo, S.J. e Jeon, Y.J. (2009). Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 65:101–107.

Holdt, S. and Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*. 23(3): 543-597.

Hoong W.C., John I., Yee G.S., Ling C.E.W., Ching T.S., Moi P.S., Aisya G.S., Tiong Y., Irvine G.A. (2018). Fucosterol inhibits the cholinesterase activities and reduces the release of pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide and amyloid-induced microglial cells. *Journal of Applied Phycology*. 30: 3261–3270.

Hou, X., Yan, X. e Chai, C. (2000). Chemical species of iodine in some seaweeds II. Iodine-bound biological macromolecules. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 245: 461-467.

Jiménez-Escrig, A., Jiménez-Jiménez, I., Pulido R. e Saura-Calixto, F. (2001). Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *Journal of the Science of Food Agriculture*. 81(5): 530–534.

Jin D.Q., Lim C.S., Sung J.Y., Choi H.G., Ha I., Han J.S. (2006). *Ulva conglobata*, a marine algae, has neuroprotective and anti-inflammatory effects in murine hippocampal and microglial cells. *Neuroscience Letter*. 402:154–158.

Kadam, U., Álvarez, C., Tiwari, B. e Donnell, C.P.O. *Processing of Seaweeds Em: Tiwari, B. e Troy, D. (2015). Seaweed sustainability: Food and Non-Food Applications*. Amsterdão: Academic Press. 978-0-12-4-18697-2.

Kim M., Li Y.X., Dewapriya P., Ryu B. e Kim S.K. (2013). Floridoside suppresses pro-inflammatory responses by blocking MAPK signaling in activated microglia. *BMB Reports*. 46:398–403.

Kim, S., Ravichandran, Y., Khan, S. e Kim, Y. (2008). Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 13(5): 511-523.

Lannelongue, M., Hanna, M.O., Finne, G., Nickelson, R. e Vanderzant, G. (1982). Microbiological and chemical changes during storage of swordfish (*Xiphias gladius*) steaks in retail packages containing CO<sub>2</sub>-enriched atmospheres. *Journal of Food Protection*. 45: 1197–1203.

Lee, S. C., Prosky, L. e DeVries, J. W. (1992). Determination of total, soluble, and insoluble, dietary fiber in foods - enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: Collaborative study. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*. 75: 395-416.

Le Lann, K., Jégou, C. e Stiger-Pouvreau, V. (2008). Effect of different conditioning treatments on total phenolic content and antioxidant activities in two *Sargassacean* species: Comparison of the frondose *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and the cylindrical *Bifurcaria bifurcata* R. Ross. *Phycological Research*. 56(4): 38–245.

Lim, Y. Y., e Murtijaya, J. (2007). Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. *Food Science and Technology*. 40: 1664-1669.

Lindsey White, W. e Wilson, P. *World Seaweed Utilization*. Em: Tiwari, B. e Troy, D. (2015). *Seaweed sustainability: Food and Non-Food Applications*. Amesterdão: Academic Press. 978-0-12-4-18697-2.

Ling, A., Yasir, S., Matanjun, P. e Abu Bakar, M. (2014). Effect of different drying techniques on the phytochemical content and antioxidant activity of *Kappaphycus alvarezii*. *Journal of Applied Phycology*. 27(4): 1717-1723.

Liot, F., Colin, A. e Mabeau, S. (1993). Microbiology and storage life of fresh edible seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. 5(2): 243–247

Lobban, C.S., Bischof, K., Hurd, C.L. e Harrison, P.J. (2014). *Seaweed ecology and physiology*. 2ª Edição. Cambridge: University Press. 9781139192637

López, A., Rico, M., Rivero, A. e De Tangil, M.S. (2011). The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* (algae) extracts. *Food Chemistry*. 125: 1104-1109.

Loureiro, R., Gachon, C. e Rebours, C. (2015). Seaweed cultivation: potential and challenges of crop domestication at an unprecedented pace. *New Phytologist*. 206(2): 489-492.

Mabeau, S. e Fleurence. J. (1993). Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends Food Science Technology*. 4: 103-7.

Maeda, H. (2013). Anti-obesity and anti-diabetic activities of algae. *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. 453-472.

Maillard, M.N., Soum, M.H., Boivia, P. e Berset, C. (1996). Antioxidant activity of barley and malt: relationship with phenolic content. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*. 3: 238–244.

Manivannan, K., Thirumaran, G., Devi, G.K., Hemalatha, A. e Anantharaman, P. (2008). Biochemical composition of seaweeds from Mandapam coastal regions along southeast coast of India. *American Journal of Botany*. 1: 32–37.

Marinho-Soriano, E., Fonseca, P., Carneiro, M. e Moreira, W. (2006). Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresource Technology*. 97(18): 2402-2406.

Martysiak-Żurowska, D. e Wenta, W. (2012). A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 1(11): 83-89.

McConnell, O. e Fenical, W. (1977). Halogen chemistry of the red alga *Asparagopsis*. *Phytochemical*. 16: 367-374.

McHugh, D.J. (2003). *A guide to the seaweed industry*. Acedido em 6 de Agosto, 2019. Disponível no Website da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) <http://www.fao.org/3/a-y4765e.pdf>

Mellouk, Z., Benammar, I., Krouf, D., Goudjil, M., Okbi, M. e Malaisse, W. (2017). Antioxidant properties of the red alga *Asparagopsis taxiformis* collected on the North West Algerian coast. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 13(6): 3281-3290.

Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., e van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*. 85(2): 231–237.

Mounir, M. e Salma, L.I. (2014). Evaluation of antioxidant capacity of methanol extract and its solvent fractions obtained from four Moroccan macro algae species. *Scientific European Journal*. 10: 10-15.

Mol, S., Uçok Alakavuk, D. e Ulusoy, S. (2014). Effects of modified atmosphere packaging on some quality attributes of a ready-to-eat salmon sushi. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 13(2): 394-406.

NETALGAE, (2012). Seaweed Industry in Europe. Acedido em 10 de Setembro, 2019. Disponível no Website da Netalgae. [http://www.netalgae.eu/uploadedfiles/Filieres\\_12p\\_UK.pdf](http://www.netalgae.eu/uploadedfiles/Filieres_12p_UK.pdf)

Nunes, N., Ferraz, S., Valente, S., Barreto, C. e Pinheiro de Carvalho, M.A.A. (2017). Biochemical composition, nutritional value, and antioxidant properties of seven seaweed species from Madeira archipelago. *Journal of Applied Phycology*. 29: 2427–2437

Nunes, N., Ferraz, S., Valente, S., Barreto, C. e Pinheiro de Carvalho, M.A.A. (2018a). Nutraceutical potential of *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan extracts and assessment of a downstream purification strategy. *Heliyon*, 4.

Nurshahida, M., Aini, M., Faizal, W., Hamimi, I. e Nazikussabah, Z. (2018). Effect of drying methods on nutrient composition and physicochemical properties of Malaysian seaweeds. *Conference Paper in American Institute of Physics*. 2030(1): 020113. EUA.

Okuzumi, J., Takahashi, T., Yamane, T., Kitao, Y., Inagake, M., Ohya, K., Nishino, H. e Tanaka, Y. (1993). Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine- induced mouse duodenal carcinogenesis. *Cancer Letters*. 68: 159–168.

O'Sullivan, L., Murphy, B., McLoughlin, P., Duggan, P., Lawlor, P., Hughes, H. e Gardiner, G. (2010). Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal Health Applications. *Marine Drugs*. 8(7): 2038-2064.

Oumaskour, K., Boujaber, N., Etahiri, S. e Assobhei, O. (2013). Anti-Inflammatory and Antimicrobial Activities of Twenty-Three Marine Red Algae from The Coast of Sidi Bouzid (El Jadida-Morocco). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5:145-149.

Pangestuti, R. e Kim, S.K. Seaweed Protein, Peptides and aminoacids. Em: Tiwari, B. e Troy, D. (2015). *Seaweed sustainability: Food and Non-Food Applications*. Amsterdão: Academic Press. 978-0-12-4-18697-2.

Pangestuti, R., Vo, T.S., Ngo, D.H. e Kim, S.K. (2013). Fucoxanthin ameliorates inflammation and oxidative responses in microglia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61: 3876–3883.

Paul, N., de Nys, R. e Steinberg, P. (2006). Chemical defence against bacteria in the red alga *Asparagopsis armata*: linking structure with function. *Marine Ecology Progress Series*. 306:87-101.

Pereira, H., Barreira, L., Figueiredo, F., Custódio, L., Vizetto-Duarte, C., Polo, C., Rešek, E., Engelen, A. e Varela, J. (2012). Polyunsaturated Fatty acids of marine macroalgae: potential for nutritional and pharmaceutical applications. *Marine Drugs*. 10(9): 1920-1935.

Pereira, L. (2009). *Guia Ilustrado das Macroalgas*. Coimbra: Coimbra University Press. 9892600029

Pereira, L. (2015a). Introduction to marine biotechnology. *Em: Kim, S-K. Springer handbook of marine biotechnology*. Berlin: Springer. 978-3-642-53970-1.

Prior, R.L., Wu, X. e Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 4290–4302.

Pirian, K., Moein, S., Sohrabipour, J., Rabiei, R. e Blomster, J. (2017). Antidiabetic and antioxidant activities of brown and red macroalgae from the Persian Gulf. *Journal of Applied Phycology*. 29(6): 3151-3159.

Prosky, L., Asp, N. G., Schweizer, T. F., DeVries, J. W. e Furda, I. (1988). Determination of insoluble, soluble, and total dietary fibre in foods and food products. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*. 71: 1017.

Radulovich, R., Neori, A., Valderrama, D., Reddy, C, Cronin, H. e Forster, J. *Farming of seaweeds*. *Em: Tiwari, B. e Troy, D. (2015). Seaweed sustainability: Food and Non-Food Applications*. Amesterdão: Academic Press. 978-0-12-4-18697-2.

Ragonese, C., Tedone, L., Beccaria, M., Torre, G., Cichello, F., Cacciola, F., Dugo, P. e Mondello, L. (2014). Characterisation of lipid fraction of marine macroalgae by means of chromatography techniques coupled to mass spectrometry. *Food Chemistry*. 145: 932-940.

Rajauria, G., Jaiswal, A. K., Abu-Ghannam, N., e Gupta, S. (2010). Effect of hydrothermal processing on colour, antioxidant and free radical scavenging capacities of edible Irish brown seaweeds. *International Journal of Food Science and Technology*. 45(12): 2485–2493.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., e Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical. *Free Radical Biology and Medicine*. 26(9-10): 1231–1237.

Reid, D.S. (1990). Optimizing the quality of frozen foods. *Journal of Food Technology*. 7: 78–82.

Ripol, A., Cardoso, C., Afonso, C., Varela, J., Quental-Ferreira, H., Pousão-Ferreira, P. e Bandarra, N.M. (2018). Composition, antiinflammatory activity, and bioaccessibility of green seaweeds from fish pond aquaculture. *Journal of Nature Compounds*. 13(5): 603-608.

Robertson, R., Guihéneuf, F., Bahar, B., Schmid, M., Stengel, D., Fitzgerald, G., Ross, R. e Stanton, C. (2015). The Anti-Inflammatory Effect of Algae-Derived Lipid Extracts on Lipopolysaccharide (LPS)-Stimulated Human THP-1 Macrophages. *Marine Drugs*. 13(8): 5402-5424.

Roque, B., Brooke, C., Ladau, J., Polley, T., Marsh, L., Najafi, N., Pandey, P., Singh, L., Kinley, R., Salwen, J., Eloie-Fadrosh, E., Kebreab, E. e Hess, M. (2018). Effect of the macroalgae *Asparagopsis taxiformis* on methane production and rumen microbiome assemblage. *Animal Microbiome*. 1(1): 3-14.

Ryan S., O’Gorman D.M. e Nolan Y.M. (2011). Evidence that the marine-derived multi-mineral Aquamin has anti-inflammatory effects on cortical glial-enriched cultures. *Phytotherapy Research*. 25:765–767.

Saint-Denis, T. e Goupy, J. (2004). Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method. *Analytica Chimica Acta*. 515(1): 191–198.

Sánchez-Machado, D.I., López-Cervantes, J., López-Hernández, J. e Paseiro-Losada, P. (2004). An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds. *Biomedical Chromatography*. 18: 183–190.

Schmid, M., Guihéneuf, F. e Stengel, D.B. (2016). Evaluation of food grade solvents for lipid extraction and impact of storage temperature on fatty acid composition of edible seaweeds *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) and *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Food Chemistry*. 208: 161-168.

Schmitz, G. e Ecker, J. (2008). The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research*. 47: 147–155.

Sekar, S. e Chandramohan, M. (2008). Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*. 20: 113–136.

Shahidi, F. e Spurvey, S.A. (1996). Oxidative stability of fresh and heated-processed dark and light muscles of mackerel (*Scomber scombrus*). *Journal Food Lipids*. 3: 13–25.

Silva, L.M., Lima, V., Holanda, M.L., Pinheiro, P.G., Rodrigues, J.A., Lima M.E. e Benevides, N.M. (2010). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from marine red alga *Pterocladia capillacea*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 33: 830-835.

Singleton, V.L. e Rossi, J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *The American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-158.

Sosulski, F.W. e Imafidon, G.I. (1990). Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38: 1351–1356

Stévant, P., Rebours, C. e Chapman, A. (2017). Seaweed aquaculture in Norway: recent industrial developments and future perspectives. *Aquaculture International*, 25(4): 1373-1390.

Suherman, S., Djaeni, M., Kumoro, A., Prabowo, R., Rahayu, S. e Khasanah, S. (2018). Comparison Drying Behavior of Seaweed in Solar, Sun and Oven Tray Dryers. *MATEC Web Conferences - The 24<sup>th</sup> Regional Symposium on Chemical Engineering*. 156, 05007.

Takaichi, S. (2013). Distributions, biosyntheses and functions of carotenoids in algae. *Agro Food Industry Hi Tech*. 24: 55–58.

Tonon, R. V., Brabet, C., e Hubinger, M. D. (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*. 43(3): 907–914.

Vairappan, C.S., Suzuki, M., Abe, T. e Masuda, M. (2001). Halogenated metabolites with antibacterial activity from the Okinawan Laurencia species. *Phytochemistry*. 58: 517–523.

von Elbe, J.H. e Schwartz, S.J. Colorants. *Em: Fennema, O.R. (1996). Food chemistry*. 3ªEdição. Nova Iorque: Marcel Dekker. 9780824796914

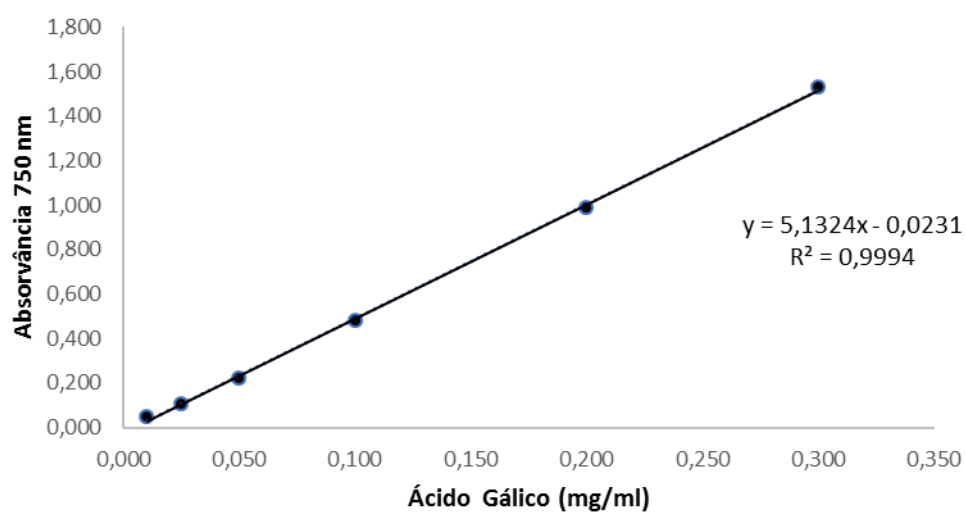
Wong, K. e Chikeung Cheung, P. (2001). Influence of drying treatment on three Sargassum species. *Journal of Applied Phycology*. 13(1): 51-58.

Yildiz, G., Vatan, Ö., Çelikler, S. and Dere, Ş. (2011). Determination of the Phenolic Compounds and Antioxidative Capacity in Red Algae *Gracilaria bursa-pastoris*. *International Journal of Food Properties*. 14(3): 496-502.

Zhou, R. Shi, X.Y., Bi, D.C., Fang, W.S., Wei, G.B. e Xu, X. (2015). Alginate-Derived Oligosaccharide Inhibits Neuroinflammation and Promotes Microglial Phagocytosis of  $\beta$ -Amyloid. *Marine Drugs*. 13: 5828–5846.

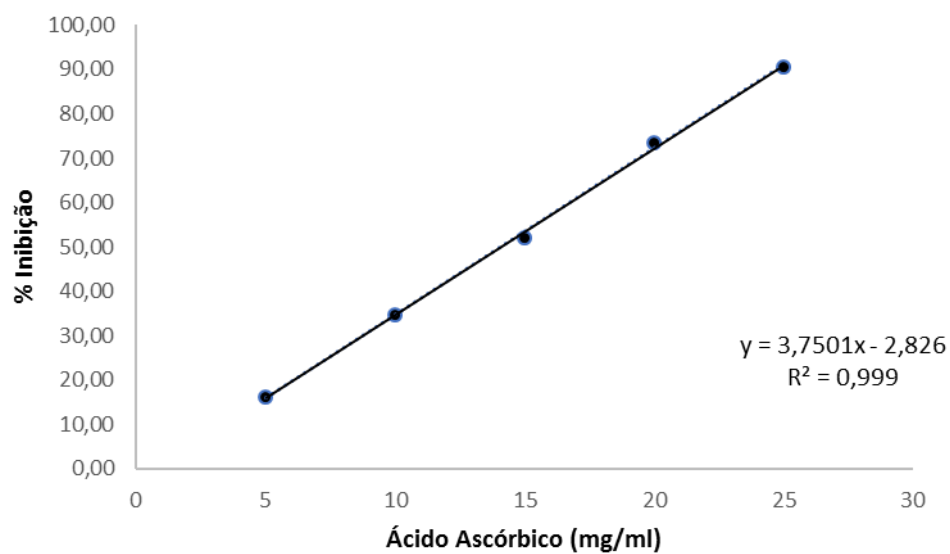
## 7. Anexos

### Anexo I



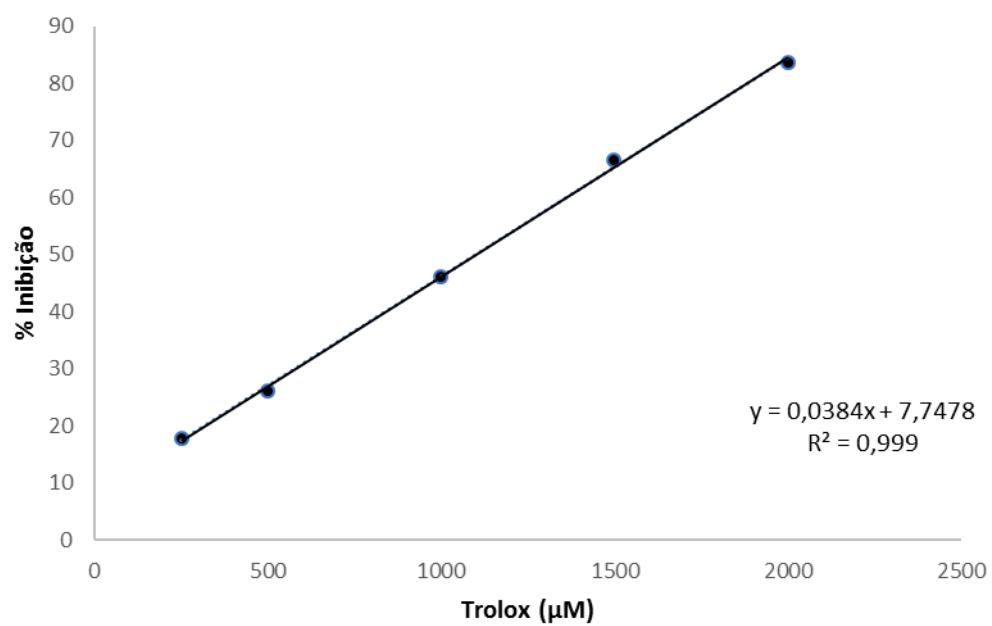
**Figura 12:** Curva de calibração para quantificação do teor de polifenóis totais com padrões de ácido gálico (0,010 – 0,300 mg/ml).

### Anexo II



**Figura 13:** Curva de calibração para quantificação da atividade antioxidante (DPPH) com padrões de ácido ascórbico (5 – 35 mg/ml).

### Anexo III

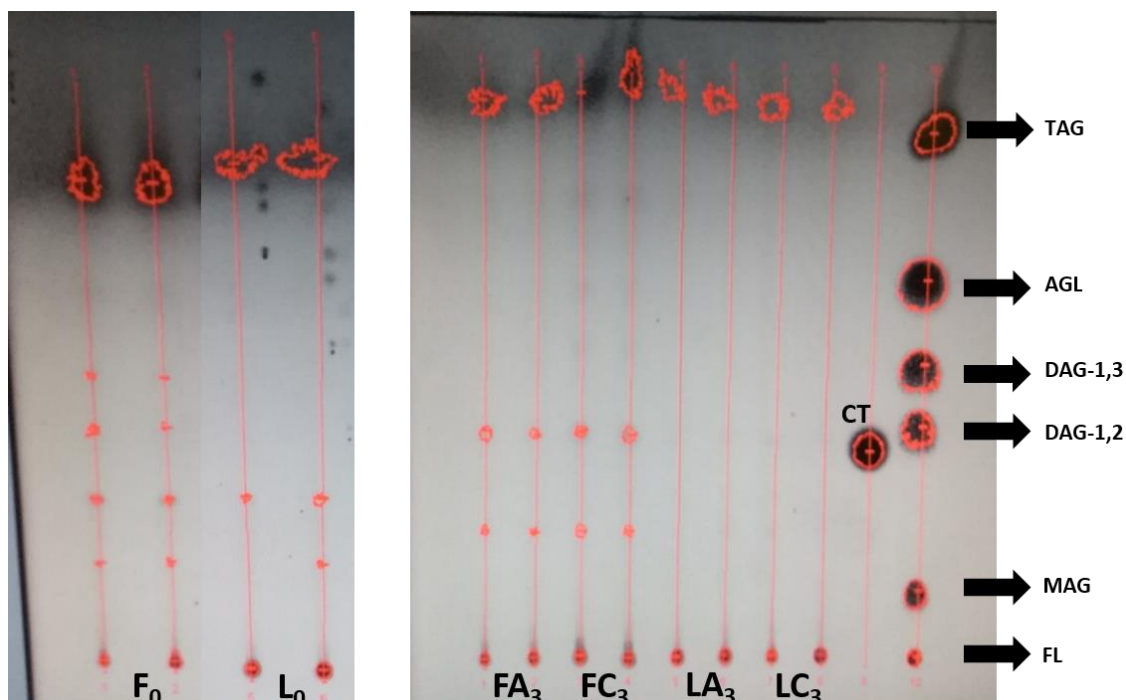


**Figura 14:** Curva de calibração para quantificação da atividade antioxidante (ABTS) com padrões de trolox (250-2500  $\mu\text{M}$ ).



## Anexo IV

(A)



**Figura 15:** Distribuição das classes lipídicas da *A. taxiformis* nas placas de TLC. À esquerda, a distribuição obtida (em duplicado) para as amostras iniciais, t=0 (F – seca no forno e L – liofilizada); à direita a distribuição obtida (em duplicado) para as amostras finais, t=3 (FA e FC – amostras secas no forno, armazenadas à temperatura ambiente (A) e à temperatura de congelamento (C); LA e LC – amostras liofilizadas, armazenadas à temperatura ambiente (A) e à temperatura de congelamento (C); padrão do colesterol (CT) e padrão misto (triacilglicerol (TAG), 1,2 e 1,3-diacilglicerol (DAG-1,2 e DAG-1,3), monoacilglicerol (MAG), ácidos gordos livres (AGLs), fosfatidilcolina (FL)).

(B)

**Tabela 10: Classes lipídicas (% relativa)** da *A. taxiformis* obtidas por TLC, usando hexano, éter e ácido fórmico (50:50:2) como fase móvel. Entre a classe dos MAG e a classe dos DAG-1,2 foi identificada uma classe denominada por classe dos “Mais Polares”; entre a classe dos AGs e a classe dos TAG foi identificada uma classe denominada por classe da “Polaridade Intermédia”; acima da classe dos TAG foi identificada uma classe denominada por classe dos “Mais Apolares”. Os valores encontram-se apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão.

Classe Lipídica	F <sub>0</sub>	L <sub>0</sub>	FA <sub>3</sub>	FC <sub>3</sub>	LA <sub>3</sub>	LC <sub>3</sub>
Mais Apolares	74,1 $\pm$ 0,4	83,4 $\pm$ 0,9	70,35 $\pm$ 3,7	50,7 $\pm$ 2,4	55,8 $\pm$ 2,5	71,5 $\pm$ 0,2
TAG						
Polaridade Intermédia	4,39 $\pm$ 0,29			17,8 $\pm$ 2,3		
AGLs	6,21 $\pm$ 0,78					
DAG-1,3	2,90 $\pm$ 0,49					
CT + DAG-1,2	4,24 $\pm$ 0,07	1,64 $\pm$ 0,83	11,1 $\pm$ 0,5	13,6 $\pm$ 0,6		
Mais Polares	2,08 $\pm$ 0,21	1,03 $\pm$ 0,41	2,62 $\pm$ 1,5	4,96 $\pm$ 0,29		
MAG						
FL	6,12 $\pm$ 0,05	14,0 $\pm$ 0,5	16,0 $\pm$ 1,7	13,0 $\pm$ 0,2	44,2 $\pm$ 2,5	28,5 $\pm$ 0,2

## ANEXO V

### Lipid Composition of the brown seaweed *Cystoseira abies-marina* and the red seaweed *Asparagopsis taxiformis*

Regal A.L., Guarda I., Fonseca I., Gomes R., Matos J., Cardoso C., Afonso C., Gomes A. & Bandarra N.M.



narcisa@ipma.pt

#### Introduction

- Seaweeds (SW) an important part of marine food web, are still an underexploited resource and represent as food a smaller carbon footprint
- SW have nutritional value  $\Rightarrow$  **health benefits**

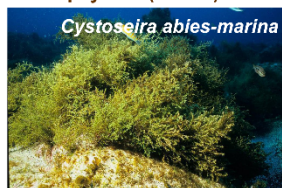
This work intend to characterize the lipid composition of a brown, *Cystoseira abies-marina*, and a red, *Asparagopsis taxiformis*, SW species.

#### Methods & Results

##### Samples

SW harvested in the Azores islands (in mid-North Atlantic).

##### Phaeophyceae (Brown)



##### Rhodophyta (Red)



##### Analysis

Total lipid content (liquid-liquid extraction, Folch method), main lipid classes (TLC), and fatty acid (FA) profile (GC-FID) were determined.

##### Fatty Acids (% of total FA and mg/100g dw)

Fatty acid	<i>C. abies-marina</i>		<i>A. taxiformis</i>	
	%	mg/100 g dw	%	mg/100 g dw
14:0	6.8±0.2	37.8±1.4	15.6±1.0	98.6±12.5
16:0	34.3±1.3	189.5±7.3	57.1±2.3	375.5±56.7
$\Sigma$ SFA	46.9±0.2	259.2±11.2	76.2±3.2	501.5±77.3
18:1 $\omega$ 9	18.2±0.2	100.9±1.4	4.0±0.1	26.3±2.4
18:1 $\omega$ 7	0.2±0.0	0.8±0.2	2.1±0.4	13.5±1.8
$\Sigma$ MUFA	21.0±0.1	116.3±0.8	9.8±1.5	63.8±5.4
20:4 $\omega$ 6	15.2±0.5	84.2±2.8	1.7±0.4	11.1±1.7
20:5 $\omega$ 3	1.9±0.1	10.3±0.5	8.6±1.7	55.5±4.9
$\Sigma$ PUFA	30.2±0.6	167.1±3.3	10.5±2.5	67.9±8.4
$\omega$ 3	8.5±0.2	46.9±0.9	8.6±1.7	55.4±4.9
$\omega$ 6	21.4±0.5	118.5±2.7	1.9±0.9	12.4±3.6

##### Lipids (g/100g dw)

Seaweed	Total lipid
<i>C. abies-marina</i>	0.79±0.13
<i>A. taxiformis</i>	3.40±0.29

##### Lipid Classes (% of total lipid classes)

Seaweed	PL	ST + 1,2 DAG	1,3 DAG	FFA	TAG	Others
<i>C. abies-marina</i>	5.1±1.2	13.6±0.4	5.9±0.2	7.9±0.6	13.2±0.1	54.3±1.8
<i>A. taxiformis</i>	14.0±0.4	1.6±0.83	nd	nd	nd	84.4±1.3

PL - Phospholipids; ST - Sterols; DAG - Diacylglycerols; FFA - Free fatty acids; TAG - Triacylglycerols; nd - not detected

The results showed differences between these SW species. However, lipid levels were low for both species. It was found that each SW species had a particular FA profile. For both SW species, high percentages of palmitic acid (16:0) and low levels of n-3 polyunsaturated FA were registered. A deep characterization of unknown lipid classes will be carried out in future work.



#### Acknowledgments

This work was supported by the following Post Doctoral Grants: SFRH/BPD/102689/2014 ("Fundação para a Ciência e a Tecnologia", FCT) for Carlos Cardoso and DIVERSIAQUA project (Mar 2020) for Cláudia Afonso. Experimental work was supported by the MAR 2020 projects I9+ PROALGA (Ref.: 16-01-03-FMP-0011) and DIVERSIAQUA (Ref. MAR2020-16-02-01-FMP-0066).

**Figura 16:** Poster submetido no 49º congresso WEFTA (West European Fish Technologists Association), decorrido entre 14-18 de outubro de 2019 em Tórshavn, Ilhas Faroe.